

**Produktion von monoklonalen Antikörpern
gegen Differenzierungsantigene
von Schweinelymphozyten**

Marlis D. Lindecke



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554801_0098

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr
Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Prof. Dr. H. Buschmann

**Produktion von monoklonalen Antikörpern
gegen Differenzierungsantigene
von Schweinelymphozyten**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Marlis D. Lindecke
aus
Kirschweiler

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. H.G. Buschmann

Korreferent: Prof. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1 Bedeutung der Lymphozytensubpopulationen für Immunreaktionen	2
2.1.1 Zellen des Immunsystems, deren Funktion und Unterscheidung	2
2.1.2 Haupthistokompatibilitätskomplex und seine genetische Determination	8
2.1.3 Regulation des Immunsystems	12
2.2 Monoklonale Antikörper	13
2.2.1 Entwicklung geeigneter Fusionspartner	15
2.2.2 Faktoren, die die Fusion beeinflussen	17
2.2.3 Faktoren, die die Produktion von monoklonalen Antikörpern beeinflussen	19
2.2.4 Anwendung von monoklonalen Antikörpern	20
2.2.5 Monoklonale Antikörper gegen Differenzierungsantigene von Schweinelymphozyten	22
2.2.6 Nachweis von monoklonalen Antikörpern	24
3. Material und Methoden	26
3.1 Materialien	26
3.2 Herstellung von monoklonalen Antikörpern	27
3.2.1 Antigen-Herstellung	27
3.2.2 Immunisierung von Mäusen	27
3.2.3 Kultivierung von Myelomzellen	28
3.2.4 Zellfusion	28
3.2.5 Kultivierung von Hybridomzellen	30
3.2.6 Klonierung	30
3.2.7 Einfrieren und Auftauen von Hybridomzellen	31
3.2.8 Produktion von Hybridomzellen in Mäusen	32
3.3 Nachweis der gegen Schweinelymphozyten gerichteten monoklonalen Antikörper	33

	Seite
3.4 Reinigung der monoklonalen Antikörper	34
3.4.1 Ammoniumsulfatfällung	34
3.4.2 Protein-A-Affinitätschromatographie	34
3.5 Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern	35
3.5.1 Bestimmung der Immunglobulinklassen und -subklassen	35
3.5.2 Mercaptoäthanol-Behandlung	36
3.5.3 Proteinbestimmung	36
3.5.4 Titerbestimmung	37
3.5.5 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	37
3.5.6 Differenzierung mittels Immunofluoreszenz	41
4. Versuche und Ergebnisse	43
4.1 Vergleich der Immunisierungsschemata	44
4.2 Ausbeute an Hybridomlinien	45
4.3 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper	48
4.3.1 Bestimmung der Immunglobulinklassen und -subklassen	48
4.3.1.1 Immunglobulinklassen und -subklassen und deren Reinigung	50
4.3.1.2 Extinktionswerte nach Mercaptoäthanol-Behandlung	51
4.3.2 Bestimmung der Antikörpertiter	52
4.3.2.1 Titerbestimmung im Zellkulturüberstand	52
4.3.2.2 Vergleich der Titer im Zellkulturüberstand und im Exsudat	54
4.3.3 Bestimmung der Antikörperkonzentration	56
4.3.3.1 Proteinbestimmung	56
4.3.3.2 Ermittlung der IgM-Titer	58
4.3.4 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	59
4.3.5 Differenzierung mittels Cytofluorometrie	60
5. Diskussion	68
6. Zusammenfassung	72
7. Literaturverzeichnis	74

1. Einleitung

Ein funktionierendes System der zellulären Immunität ist die Voraussetzung zur Abwehr von Infektionen beim Säugetier. Beim System der zellulären Immunität handelt es sich um ein komplexes System, bei dem verschiedene Zellsysteme (T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen) kooperieren. Seit längerer Zeit ist bekannt, daß es innerhalb der Gruppe der Immunozyten Zellsysteme mit unterschiedlicher Funktion gibt: Helfer- und Suppressorzellen, zytotoxische Zellen, für die Abstoßung von Allotransplantaten verantwortliche Zellen und Zellen, die die Graft-versus-Host-Reaktion bewirken. Eine Identifizierung und Differenzierung dieser Zellsysteme mit konventionellen Methoden (Rosetten-techniken, Komplement- und Ig-Fc-Rezeptoren an der Zelloberfläche, Nachweis von Oberflächen-Immunglobulinen) führte bisher nur zu Teilerfolgen. Grundsätzlich neue Möglichkeiten erschließen sich durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern.

Monoklonale Antikörper sind das Produkt von Hybridomzellen, die aus der Fusion von B-Lymphozyten und Myelomzellen mit anschließender Klonierung hervorgehen. Da monoklonale Antikörper so spezifisch sind, daß sie nur gegen eine antigene Determinante gerichtet sind, bietet sich diese Technik für die Unterscheidung der Immunzellen anhand ihrer verschiedenen Zelloberflächenantigene an.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, monoklonale Antikörper herzustellen, die gegen Schweinelymphozyten gerichtet sind. Sie wurden hinsichtlich ihrer Immunglobulinklassen und -subklassen charakterisiert und auf ihre Spezifität gegenüber Schweinelymphozyten getestet.

2. Literaturübersicht

2.1 Bedeutung der Lymphozytensubpopulationen für Immunreaktionen

2.1.1 Zellen des Immunsystems, deren Funktion und Unterscheidung

Die Fähigkeit zur Immunreaktion hat sich im Laufe der Evolution entwickelt. Sie wird durch Antigen stimuliert und löst eine Serie von Interaktionen der verschiedenen Zellen des immunologischen Systems aus.

Alle Zellen des Immunsystems entwickeln sich aus einer hämopoetischen Stammzelle und werden nach dem Ort ihrer Differenzierung in zwei große Gruppen eingeteilt. Während die thymusabhängigen T-Lymphozyten die funktionellen Träger der zellvermittelten Immunabwehr darstellen, sind die im sog. Bursaäquivalent determinierten B-Lymphozyten für die humorale Immunantwort verantwortlich (RICH und RICH, 1985). Nach ihrer jeweiligen Funktion lassen sich die T-Lymphozyten in Subpopulationen unterteilen: regulative T-Zellen, Effektor-T-Zellen. Zu den regulativen T-Lymphozyten zählen Suppressor- und Helfer-T-Zellen.

Suppressor-T-Zellen üben eine suppressive Wirkung auf andere immunkompetente Zellen aus. In zahlreichen Experimenten wurde gezeigt, daß das Hinzufügen von selektierten T-Zellpopulationen zur reduzierten Immunantwort führte (KATZ, 1977; GERSHON, 1974). Zum Beispiel kann man Mäuse mit Schaferythrozyten hyperimmunisieren, die die Bildung von spezifischen T-Zellen induzieren; transferiert man letztere in ein normal empfängliches Tier, so unterdrücken sie eine spezifische Antikörper-Bildung (GERSHON und KONDO, 1971).

Helfer-T-Zellen sind an der Bildung von Antikörpern gegen T-Zellabhängige Immunogene durch B-Zellen beteiligt. Sie bewirken dies, indem sie Mediatoren, sog. Lymphokine freisetzen. Einer dieser löslichen Faktoren übt einen aktivierenden Effekt auf die B-Zellen

aus (ESCHHAR et al., 1980). Ein anderer beeinflusst die Proliferation von B-Zellen und löst die Synthese bzw. Sekretion von Antikörpern aus (SCHIMPL et al., 1980). SMITH et al. (1980) beschrieben einen dritten Faktor (Interleukin 2), der die Proliferation von Effektorzellen stimuliert.

Zu den relativ kurzlebigen Effektor-Zellen gehören die für die Transplantatabstoßung, die zellvermittelte Zytotoxizitätsreaktion und die Entstehung einer allergischen Reaktion vom verzögerten Typ verantwortlichen Zellen. Länger lebende Gedächtniszellen stellen Zellklone dar, die einen erneuten Antigen-Kontakt mit einer vergleichsweise schneller einsetzenden und umfangreicheren Immunantwort beantworten. Sie werden von T- wie von B-Lymphozyten gebildet (RICH und RICH, 1985).

B-Lymphozyten besitzen in ihrer Membran antigenspezifische Immunglobulinmoleküle als Rezeptoren, so daß sie nach Kontakt mit dem jeweiligen Antigen aktiviert werden und sich zu Plasmazellen differenzieren. Die Plasmazellen stellen dann die zur Produktion antigenspezifischer Antikörper befähigte Zellpopulation dar. Diese Antikörper sind wiederum Immunglobuline (Ig), die mit den ehemals membranständigen Ig-Molekülen identisch sind (WARNER, 1974).

Die Antikörper-Synthese ist teilweise abhängig von der Kooperation mit T-Zellen, was sich an Tieren nachweisen läßt, die einen Mangel an T-Zellen haben und deren Immunreaktion eingeschränkt ist. Bei der B-T-Zellkooperation spielen Determinanten der I-Region des H2-Systems bei der Maus eine entscheidende Rolle (KATZ, 1980). Es ist zu unterscheiden zwischen T-Zellabhängigen und T-Zellunabhängigen Immunogenen (BASTEN und HOWARD, 1973). Die T-Zellunabhängige Immunantwort ist gekennzeichnet durch eine Dominanz der IgM-Antikörper-Produktion und ein Fehlen von Gedächtniszellen (KATZ, 1977; KATZ und BENACERRAF, 1972; DAVIE und PAUL, 1974). Dies läßt darauf schließen, daß T-Zellen zwar die Antikörper-Synthese, besonders von IgG, erhöhen und die Differenzierung zu Gedächtnis-B-Zellen beeinflussen, aber die Antikörper-Produktion nicht völlig von ihrer Vermittlung abhängig ist.

Zusätzlich existieren Zellen, die weder T- noch B-Zellen zuzuordnen sind. Sie werden als Nullzellen bezeichnet und sind in der Lage, als fremd erkannte Zellen zu lysieren. Man unterscheidet zwischen einer spezifischen und einer nicht-spezifischen Zytotoxizitätsreaktion. Die Ausbildung spezifischer zytotoxischer 'Killer'-Zellen (K-Zellen) setzt eine Sensibilisierung mit dem betreffenden Antigen voraus. Die Reaktion ist Antikörper-vermittelt, d.h. sie erkennen den Antikörper-Antigen-Komplex mit Hilfe ihres Fc-Rezeptors und lysieren ihn. Für die nicht-spezifische Zytotoxizitätsreaktion werden sog. 'natürliche Killerzellen' (NK-Zellen) verantwortlich gemacht. Diese treten bei einem Erstkontakt ohne vorherige "Erfahrung mit dem Antigen" auf (ROITT, 1985).

Des weiteren sind Makrophagen besonders für die immunologische Primärreaktion von entscheidender Bedeutung. Sie nehmen eine wichtige Stellung bei der Aufnahme, dem Katabolismus und der Präsentation des Antigens ein, die dann zur Initiation der Immunreaktion führen (DRESSER und MITCHISON, 1968; UNANUE, 1972). Sobald sie Kontakt mit Antigenen haben, wird ein Teil phagozytiert und ein anderer Teil an der Zelloberfläche gehunden, um so aufbereitet eine spezielle Immunantwort auszulösen. Den verschiedenen Zellsystemen kommen unterschiedliche Funktionen zu: Kupffer'sche Sternzellen der Leber und Alveolar-Makrophagen sind vorwiegend nicht spezifische Effektorzellen, sie weisen viele lysosomale Granula auf und phagozytieren aktiv (UNANUE et al., 1976). Dendritzellen der Lymphknoten und der Haut (Langerhans'sche Zellen) dagegen inkorporieren das Antigen an ihrer Oberflächenmembran, um es so den Lymphozyten zu präsentieren. Dieser Vorgang der Präsentation erfolgt in Assoziation mit Histokompatibilitätsantigenen (PIERCE et al., 1976; MILLER, 1980). Daß ein Informationstransfer stattfindet, konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bewiesen werden, und daß eine Kooperation zwischen Makrophagen und Antikörper-produzierenden Lymphozyten besteht, zeigten MORETTA et al. (1980). Makrophagen besitzen Oberflächenrezeptoren mit der Fähigkeit, IgG1 und IgG3 am Fc-Fragment zu binden. Weitere Rezeptoren für C3 ermöglichen die Bindung von Komplement über den Komplement-Anti-

gen-Antikörper-Komplex. Makrophagen sind zwar nicht zur Antikörper-Produktion befähigt, induzieren und stimulieren diese aber über einen Informationstransfer auf die antigensensitiven und immunkompetenten Immunoblasten.

B- und T-Lymphozyten lassen sich morphologisch nicht unterscheiden, sie besitzen jedoch eine mit unterschiedlichen Eigenschaften ausgestattete Oberfläche, so daß sie anhand dieser Merkmale differenziert werden können. Es wurden verschiedene Methoden entwickelt, die zur Charakterisierung der B- und T-Zellen benutzt werden:

Eine der Möglichkeiten zur Differenzierung des Lymphozytentyps ist der Nachweis von Oberflächenmembran-Ig (Sig), einem Merkmal für B-Lymphozyten. Diese Immunglobuline können mit Hilfe spezifischer Antiglobuline identifiziert werden (RAFF, 1971). Mit Hilfe dieser Methode ist eine quantitative Bestimmung des Anteils der thymus-unabhängigen B-Lymphozyten an einer Population möglich (MUSCOPLAT et al., 1974a).

Weitere Möglichkeiten zur Differenzierung der Lymphozyten bestehen im Nachweis von Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit Hilfe verschiedener Rosettentechniken. Diese beruhen auf der Fähigkeit, verschiedener Lymphozytenpopulationen mit verschieden vorbehandelten heterologen Erythrozyten, wie z.B. Schaferythrozyten (SRBC), Rosetten zu bilden. T-Lymphozyten bilden Spontanrosetten (E-Rosetten), während B-Lymphozyten mit Hilfe ihrer Fc-Rezeptoren nur nach Vorbehandlung der SRBC mit IgM-Antikörpern und Komplement EAC-Rosetten bilden (BROWN und GREAVES, 1974; BINNS, 1982). Da B-Zellen ebenfalls Rezeptoren für das Fc-Fragment von IgG besitzen, können sie durch einen weiteren Rosettentest (EA-Rosetten) identifiziert werden (SHANNON und HASTINGS, 1977).

Auch die unterschiedliche Empfindlichkeit beider Zellpopulationen gegenüber einer Röntgenbestrahlung, gegenüber der Einwirkung von Corticosteroiden und Antilymphozytenserum zieht man zur Differenzierung heran. Ferner ist der mitogene Effekt von Concanavalin A, Phytohämagglutinin und Pokeweed-Mitogenen verschieden gegenüber B- und T-Zellen (Zusammenfassung s. BUSCHMANN und PAWLAS, 1980).

Untersuchungen zur Charakterisierung der Subpopulationen beim Haustier erbrachten beträchtliche artspezifische Unterschiede bezüglich der Häufigkeit ihres Vorkommens und ihrer Eigenschaften. Speziell beim Schwein führten BINNS et al. (1972), BINNS et al. (1979a), BUSCHMANN und PAWLAS (1980), BINNS (1982) sowie BINNS et al. (1983) spezielle Untersuchungen bezüglich Vorkommen von Oberflächenmarkern, rosettenbildender Eigenschaften, das Verhalten gegenüber Mitogenen und verschiedene Trennverfahren der Lymphozytensubpopulationen durch.

Offensichtlich bilden jedoch nicht alle T-Lymphozyten E-Rosetten, auch andere Zellen des weißen Blutbildes tragen Komplement-Rezeptoren, Nullzellen verfügen ebenfalls über Fc-Rezeptoren, so daß die Zellseparation mit dieser Technik unvollständig erscheint (BINNS, 1982; JONJIC und KOSZINOWSKI, 1984).

Studien an Tieren mit Immundefekten wurden herangezogen, um die Funktionen der Komponenten des Immunsystems zu entschlüsseln. Man unterscheidet verschiedene Typen des Immundefektes, wobei es sich um klinisch manifeste Störungen der Immunitätsbildung handelt, die teils angeboren und genetisch bedingt, teils erworben sind. Zum ersten Typ gehören Defekte des B-Zellsystems, wie z.B. die kongenitale Agammaglobulinämie des Kindes. Das Krankheitsbild ist durch einen vollständigen Ausfall der humoralen Immunität bei ungestörter zellulärer Immunität charakterisiert (COOPER, 1978). Dies äußert sich in Infektionen durch pyogene, aber auch durch nur schwach pathogene Keime im Bereich der Haut, des Respirations- und des Verdauungstraktes. Ein vergleichbares Immundefizit kommt sehr selten bei Vollblut- und Warmblutfohlen als primäre Agammaglobulinämie vor. Im Blut dieser Tiere fehlen die B-Lymphozyten, und in Immunisierungsversuchen erweist sich die Antikörper-Bildung als mangelhaft oder fehlend (PERRYMAN, 1979). Außerdem ist bei Fohlen verschiedener Rassen ein selektiver Mangel an IgM bekannt. Bei Rindern (Dänische Rotbunte) wurde ein selektiver Mangel an IgG2 beschrieben, der mit Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen (Mastitis, Gastroenteritis, Bronchopneumonie) verbunden war. Bei bestimmten Zuchtlinien der Leghorn-Hühner ist eine erbliche Dysgammaglobulinämie bekannt, bei welcher es sich gleichfalls um eine selektive Hypogammaglobulinämie handelt (Zusammenfassung s. TRAUTWEIN, 1982).

Der zweite Typ ist gekennzeichnet durch einen Mangel an T-Lymphozyten. Typisch für derartige T-Zelldefekte ist bei Mensch und Tier die Neigung zu Infektionen mit Viren, Bakterien, Pilzen und Protozoen (LEHMANN, 1985). Störungen der zellvermittelten Immunität sind beim Menschen (Di George-Syndrom) und bei Nacktmäusen und Nacktratten bekannt. Ein weiteres Beispiel stellt die Parakeratose des Kalbes (Letalfaktor A 46) dar (PERRYMAN, 1979). Dieser Krankheit liegt eine autosomale, rezessive Störung der Zinkverwertung zugrunde, welche auf einer Beeinträchtigung der Absorption im Darm basiert. Neben der Hauterkrankung weisen die Tiere jedoch auch eine schwere Störung der zellulären Immunität auf. Sie wird durch eine rasch fortschreitende Involution des Thymus ausgelöst (TRAUTWEIN, 1982).

Die schwerste Form der Immunmangelkrankheit stellt der kombinierte B- und T-Zelldefekt dar. Er ist beim Menschen als 'Schweizer Typ der Agammaglobulinämie' bekannt. Beim Pferd kommt er bei ca. 2,5 % der Araberfohlen vor (SPLITTER et al., 1980). Charakteristisch für den autosomal-rezessiv vererbten Immundefekt der Fohlen ist neben einer Lymphopenie und Hypogammaglobulinämie im Blut wiederum die hohe Anfälligkeit gegenüber Infektionen. Der Immundefekt ist jedoch auf B- und T-Zellen beschränkt, bezüglich Zahl und Funktion der neutrophilen Granulozyten und Monozyten ergeben sich keine Abweichungen von der Norm. Auch das Komplementsystem ist offenbar nicht in die Störung mit einbezogen.

Neben den angeborenen Immunmangelkrankheiten kennt man die erworbenen Immundefekte, die sekundär im Zusammenhang mit verschiedenen Primärkrankheiten auftreten. Besonderes Interesse verdienen hierbei Virusinfektionen, als Beispiele sind zu nennen: Virusdiarrhoe des Rindes, Schweinepest, Staupe des Hundes, Panleukopenie der Katze und die Herpes-Virus-I-Infektion bei neugeborenen Fohlen. Sekundäre Immundefekte lassen sich auch durch immunsuppressive Therapie sowie durch ionisierende Bestrahlung künstlich erzeugen (Zusammenfassung s. TRAUTWEIN, 1982).

2.1.2 Haupthistokompatibilitätskomplex und seine genetische Determination

Lymphozyten lassen sich nicht nur aufgrund ihrer Membranrezeptoren für E-, EA- und EAC-Rosetten, ihrer Oberflächenimmunglobuline und ihrer unterschiedlichen Stimulierbarkeit durch Mitogene, sondern auch durch weitere antigene Eigenschaften charakterisieren.

Auf der Oberfläche aller von einem Säuger abstammenden Zellen befinden sich antigene Determinanten, die von den Zellen fremder Individuen erkannt werden. Diese Epitope bestehen aus den auf der Zelloberfläche sitzenden Glycoproteinen. Die Information für die Synthese dieser Determinanten ist in einer bestimmten genetischen Region verankert, die als Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) bezeichnet wird (GÖTZE, 1977; SNELL et al., 1976; DAUSSET, 1977).

Die genauesten Kenntnisse liegen bis heute über das MHC-System der Maus vor. Es wird H-2-Gen-Komplex genannt und liegt auf dem 17. Chromosom. Der H-2-Gen-Komplex wird in fünf Regionen unterteilt, die aus vielen Genen zusammengesetzt sind, deren unterschiedliche Kombinationen die Ausprägung zahlreicher antigener Strukturen zulassen. Dem Zentromer am nächsten liegt die K-Region, der die I-, S-, G- und D-Regionen folgen (KLEIN, 1979; SHREFFLER und DAVID, 1975; KATZ, 1977). Die K- und D-Region enthalten Gene mit der Information zur Ausbildung serologisch identifizierbarer Antigene, die auf der Oberfläche aller kernhaltigen Körperzellen gefunden wurden und bei einer Transplantatabstoßung eine wichtige Rolle spielen, indem sie als "Ziel" für zytotoxische Zellen dienen (KATZ, 1977). Die auf der S-Region liegenden Gene enthalten die Information für die Ausbildung der vierten Komponente des Komplementsystems (SHREFFLER, 1976; SCHREFFLER et al., 1976). Die G-Region enthält Gene für die Ausbildung antigener Determinanten auf Erythrozyten.

Die I-Region besteht aus fünf Subregionen: A, B, C, E und J, die man anhand ihrer Funktion unterscheiden kann. Beispielsweise ist die I-J-Subregion für die Kontrolle der Suppressor-T-Zellfunktion zuständig.

Die I-A-, I-B- und I-C-Subregionen enthalten Gene, die die Immunantwort auf T-Zellabhängige Antigene und die Kooperation mit T-Zell-abhängigen B-Zellen kontrollieren (KATZ und BENACERRAF, 1976). Deshalb werden diese Gene als Ir- (Immune response-) Gene bezeichnet. Gene aus denselben Regionen rufen die Ausbildung antigenener Determinanten, der sog. Ia- (Immune region associated-) Antigene, auf der Zelloberfläche hervor (KLEIN, 1979). Lymphozyten, die unterschiedliche Ia-Antigene tragen, können sich in vitro gegenseitig zur Mitose und Transformation anregen (Mixed Lymphocyte Reaction). Erkennt eine Zelle ein fremdes Ia-Antigen auf der Membran eines lebenden, allogenen Lymphozyten, beginnt sie, sich zu transformieren und sich zu teilen.

Nachdem man entdeckt hatte, daß die Funktion der zytotoxischen T-Lymphozyten bei der Maus entscheidend von den H-2-Antigenen abhängen (ZINKERNAGEL und DOHERTY, 1979), wurde eine kausale Beziehung zwischen Krankheitsresistenz und Allelen des polymorphen H-2-Systems vermutet.

Über die Frage, inwieweit eine Immunantwort genetisch determiniert ist, können Rassenvergleiche und Selektionsexperimente Aufschluß geben. Signifikante Rassenunterschiede hinsichtlich des AK-Bildungsvermögens gegenüber Schaferythrozyten (SRBC) konnten bei Schweinen gezeigt werden (BUSCHMANN et al., 1974). Ebenso wurden bei der Phagozytenaktivität von ingezüchteten Mäusen und deren Kreuzungen deutliche Stammesunterschiede nachgewiesen (BUSCHMANN, 1973; MEYER et al., 1973). Beim Schwein waren Korrelationen zwischen der Variation der Phagozytenaktivität der Leukozyten und der Immunreaktion auf partikuläre Antigene signifikant (BUSCHMANN et al., 1974). Genetisch bedingte Unterschiede hinsichtlich der Reaktivität der T-Lymphozyten wurden mittels Stimulationstests mit Phytohämagglutinin und Conavalin A beim Rind ermittelt (ENTRINGER, 1980). In einem anderen Selektionsversuch wurden Schweine über vier Generationen auf ihr Antikörper-Bildungsvermögen gegenüber Dinitriphenyl-Hapten (DNP) selektiert. Die Antikörper-Reaktion gegenüber DNP-Hapten ist eine kombinierte T- und B-Zellreaktion. In der vierten

Generation waren die selektierten Tiere in ihrer Antikörper-Antwort den Kontrolltieren deutlich überlegen (KRÄUSSLICH et al., 1983). Die Kapazität des zellulären Systems blieb in der selektierten Linie unbeeinflusst. Gegenüber einer Immunisierung mit T4-Phagen, Hühnereialbumin und Tetanustoxoid zeigte die selektierte Linie eine erhöhte Antikörper-Antwort, während die zelluläre Immunität unbeeinflusst blieb (KLEINSCHMIDT, 1983). Selektionsexperimente bei Mäusen auf Antikörper-Bildungsvermögen (BIOZZI et al., 1979) sowie auf Phagozytosefähigkeit der Makrophagen (BUSCHMANN und MEYER, 1981) wurden erfolgreich durchgeführt. Bei letzterem wurden zwei Linien mit hohem und niedrigem Phagozytosevermögen gezüchtet. Als einziges Selektionskriterium diente die Wiederausscheidungsrate von injizierten Tuschepartikeln aus dem Blut. Es zeigte sich, daß das untersuchte Merkmal genetisch determiniert ist und einer polygenen Steuerung unterliegt. Unterschiede zwischen der Linie mit hohem Phagozytosevermögen (H-Linie) und der mit niedrigem Phagozytosevermögen (L-Linie) waren im Verlauf der Selektion ab der F3-Generation ebenso wie Geschlechtsunterschiede signifikant.

Erkenntnisse über die Wechselwirkung der an der Immunregulation beteiligten Zellsysteme, dem polyvalenten Schutz des Immunsystems gegenüber Infektionen und über die an der Regulation der Genantwort beteiligten Gensysteme und Anzahl der Genorte erbrachten die Arbeiten von BIOZZI et al. (1979). Hierbei wurde das Verhalten einzelner immunologischer Parameter der zellulären und der humoralen Immunität in Selektionsexperimenten am Modell Maus untersucht. In fünf voneinander unabhängigen Selektionsexperimenten mit H- und L-Linien wurde auf Antikörper-Bildungsvermögen gegenüber Schaf- und Taubenerythrozyten, Salmonellenantigenen, Rinderserumalbumin bzw. gegen Kaninchengammaglobulin selektiert. Das Selektionsmaximum war nach 7 bis 16 Generationen erreicht, d.h. es lag vermutlich Homozygotie innerhalb der Linien auf den Genorten vor, die das Antikörper-Bildungsvermögen kontrollieren. Folgende Schlußfolgerungen wurden gezogen:

- Zelluläre und humorale Immunität unterliegen einer voneinander unabhängigen genetischen Kontrolle.

- Die Aufbereitung des Antigens in den Makrophagen ist der letzte Grund dafür, daß die H-Linie besser Antikörper gegen SRBC bildet als die L-Linie.
- Eine Gruppe von ca. 10 Genen kontrolliert die Antikörper-Antwort auf Schaf- bzw. Taubenerythrozyten. Davon ist ein Gen mit dem H-2-Komplex (LIACOPOULUS-BRIOT et al., 1972), ein anderes mit dem Ig-Allotyp (BIOZZI et al., 1970; LIEBERMANN et al., 1972) verbunden.

MHC-assoziierte Krankheiten beim Haustier sind bekannt. PRESTON et al. (1983) stellten fest, daß Lymphozytenangigen-Haplotypen die Infektion mit bestimmten Theilerien beeinflussen, SOLBU et al. (1982) fanden Beziehungen zu unterschiedlicher Mastitisempfindlichkeit, und das Auftreten von Lymphosarkomen bei Jerseyrindern scheint ebenfalls MHC-abhängig zu sein (BORTOLOZZI und HINES, 1982). Weiterhin besteht eine signifikante Assoziation mit der Marek-Erkrankung des Huhnes (LONGENECKER et al., 1976; BRILLES et al., 1977). So war es möglich, anhand des MHC-Haplotyps, der beim Huhn identisch mit dem B-Blutgruppensystem ist, auf Resistenz gegen Marek-Erkrankungen zu selektieren. Auch nachdem Vaccine gegen das Herpesvirus zur Verfügung standen, stellte sich heraus, daß die postvaksinale Immunität in den resistenten Linien höher war als in den empfänglichen Linien (CALNEK, 1985).

Gerade dieses Beispiel zeigt neben dem akademischen Interesse die praktische und nicht zuletzt wirtschaftliche Bedeutung des Wissens um die genetische Determination der Infektionsresistenz. Gelingt es, sie zu lokalisieren und ihre Assoziation mit einem phänotypischen Merkmal oder einer anderen, meßbaren Größe aufzuzeigen, so sollte es möglich sein, Tiere auch hinsichtlich höherer Resistenz gegenüber Krankheiten zu züchten.

2.1.3 Regulation des Immunsystems

Die Regulation erfolgt durch äußere und innere Faktoren. Sehr wichtig ist die Art, die Menge und der physikalische Zustand des Antigens. B-Lymphozyten, die an ihrer Oberfläche Antikörper tragen, erkennen und binden das Antigen. Von diesen B-Zellen werden dann selektiv diejenigen Zellen differenziert und vermehrt, die die größte Affinität zu dem jeweiligen Antigen besitzen. Diesen Vorgang nennt man klonale Selektion. Sobald das Antigen durch Körperenzyme katabolisiert und durch Antikörper neutralisiert bzw. gebunden worden ist, fällt seine Konzentration im Organismus ab und seine Auslöserfunktion hört auf. Wie dieser Mechanismus der klonalen Selektion und des Feed-backs funktioniert, zeigt sich am Krankheitsbild der Multiplen Myelosis (ROITT, 1985).

Ein weiteres, weit feineres Regulatorium ist unter dem Begriff 'Idiotypisches Netzwerk' (JERNE, 1973) bekannt. Die hypervariablen Teile des Immunglobulinmoleküls, die für die Bindung des Antikörpers an das Antigen verantwortlich sind, besitzen individuelle Aminosäuresequenzen, die von dem entsprechenden Antikörper als idiotypische Determinante erkannt werden. JERNE (1973) geht davon aus, daß die Antikörper, die gegen ein Antigen produziert werden, durch Anti-Antikörper gegen diese Antikörper reguliert werden. Durch folgende Versuchsanordnung läßt sich dies beweisen: CAZENAVE (1977) und URBAIN et al. (1977) haben eine Gruppe von Kaninchen I gegen ein Antigen immunisiert, von dem erwartet werden konnte, daß ohne Immunisierung keine Antikörper vorhanden waren. Die von I produzierten Antikörper (AK1) wurden daraufhin dazu verwendet, eine zweite Gruppe von Kaninchen (II) zu immunisieren, und die von II produzierten Antikörper (AK2) verwendete man, um eine weitere Gruppe von Kaninchen (III) zu immunisieren, welche AK3 produzierten. Alle Kaninchen wurden anschließend mit dem Antigen konfrontiert und dann auf die Idiotypspezifität der AK (Id) und deren Antigenbindung (AGB) hin untersucht. Bei den Tieren der Gruppe III, die unter normalen Bedingungen keine antigenspezifischen Antikörper besitzen dürften, wurden vier Untergruppen von Antikörpern festgestellt. Der größte Anteil dieser Tiere wies

zwar eine Idiotypspezifität auf, jedoch konnten sie das Antigen nicht binden. Ein weiterer Teil dieser Kaninchen III zeigte keine Id, jedoch AGB. Ein dritter Teil hatte weder Id noch AGB, aber bei der letzten Gruppe von Kaninchen III wurden sowohl Id als auch AGB festgestellt (SCHNURR, 1981). Treten also in einem Organismus Antikörper mit einem spezifischen Id auf, so bilden sich unabhängig von der Anwesenheit des ursprünglichen Antigens Anti-Antikörper dagegen mit Hilfe eines Idotyp-Anti-Idotyp-Erkennungsmechanismus aus (URBAIN et al., 1975). JANEWAY (1980) beobachtete, daß Antikörper, die äußerst verschiedene Spezifitäten aufwiesen und gegen ganz verschiedene Epitope auf einem Antigen gerichtet waren, oft einen gemeinsamen oder kreuzreagierenden Idotyp besaßen. So kommt es, daß T-Helferzellen aus einem Gemisch von B-Zellen diejenigen selektieren, deren Id sie erkennen; es besteht also ein Synergismus zwischen den Antigen- und Id-spezifischen T-Helferzellen bei der Antikörper-Antwort.

2.2 Monoklonale Antikörper

Voraussetzung für die Produktion von monoklonalen Antikörpern war zunächst die Möglichkeit, Zellen zu fusionieren, denn Antikörper-produzierende Zellen sind in vitro nicht über längere Zeit kultivierbar. Der entscheidende Schritt gelang KÖHLER und MILSTEIN (1975) mit der Züchtung von Zellen in vitro, die außerhalb eines Organismus Antikörper produzierten. Sie fusionierten hierzu mittels inaktiviertem Sendavirus als Fusogen Milzzellen von Mäusen (BALB/c-Stamm), die zuvor mit Schaferythrozyten immunisiert worden waren, mit einer ebenfalls von Mäusen stammenden, in vitro züchtbaren, permanenten Myelomzelllinie (P3-X63-Ag8). Sie erhielten damit Antikörper gegen Schaferythrozyten produzierende Hybridomzellen. Sie klonieren diese und selektierten somit Antikörper-produzierende Zellpopulationen, die alle von einer Einzelzelle abstammten.

KÖHLER und MILSTEIN (1975) führten den Nachweis über den Hybridcharakter ihrer Zelllinien, indem sie folgende Eigenschaften bewiesen: Sie untersuchten die Chromosomenzahl und stellten fest, daß die

Hybridomzellen mindestens zweimal soviel Chromosomen enthielten wie normale BALB/c-Zellen, wenn auch geringfügig weniger als die Summe beider elterlicher Zellen. Dies ist auf die Elimination von Chromosomen zurückzuführen, wie sie auch schon von WEISS und GREEN (1967) beobachtet wurde. Es konnte ausgeschlossen werden, daß die Fusion zwischen zwei Milzzellen stattgefunden hatte, weil die Hybridomzellen ein metazentrisches Chromosom enthielten, welches von den elterlichen P3-X63-Ag8-Myelomzellen stammte. Eine alleinige Fusion der Myelomzellen konnte nicht erfolgt sein, da die Zellpopulation Immunglobuline produzierte, die die Eigenschaften beider elterlichen Zellen aufwiesen: 1. spezifische, gegen Schaferythrozyten gerichtete Antikörper von den Milzzellen und 2. ein Protein mit Ig-Charakter von den Myelomzellen, das schon zuvor von COTTON und MILSTEIN (1973) sowie von SCHWABER und COHEN (1974) beschrieben worden war.

Das angewandte Selektivmedium verhinderte die Vermehrung von nicht fusionierten Myelomzellen. Milzzellen können in vitro unter den angegebenen Bedingungen nicht über einen längeren Zeitraum wachsen, KÖHLER und MILSTEINs (1975) Hybridomzellen wurden jedoch im Selektivmedium in vitro länger als 4 bis 5 Wochen kultiviert.

Subklonierung, also die Vereinzelung der Hybridomzellen, ermöglichte eine Stabilisierung der Antikörper-produzierenden sowie die Eliminierung von nicht Antikörper-produzierenden Hybridomzellen (KÖHLER und MILSTEIN, 1976; MILSTEIN et al, 1977). So konnte eine Anzahl von verschiedenen Antikörper-produzierenden Zellpopulationen entwickelt werden, von denen jede ihre eigenen monoklonalen Antikörper sezernierte, die chemisch homogen waren, eine konstante Avidität und Spezifität für eine antigene Determinante besaßen (FRANKEL und GERHARD, 1979; NOWINSKY et al., 1980), gleichen Ig-Klassen angehörten und lange Zeit in vivo und in vitro ohne Änderung der Spezifität gebildet wurden (KOPROWSKI et al., 1977).

Hybridomzellen sind imstande, gleichzeitig alle Ig-Ketten der elterlichen Zelllinien intrazellulär zu synthetisieren und zu sezernieren

(COTTON und MILSTEIN, 1973), wobei jede Hybridzelle zur mehrfachen Kettensynthese befähigt ist, jedoch keine neuen V-C-Kombinationen gebildet werden (KÖHLER und MILSTEIN, 1975; KÖHLER und SHULMAN, 1978; MILSTEIN und KÖHLER, 1977; MILSTEIN et al., 1979).

2.2.1 Entwicklung geeigneter Fusionspartner

Um Zellhybride mit Antikörper-Sekretion zu produzieren, sind zum einen Antikörper-sezernierende B-Zellen notwendig und zum anderen Zellen, die sich in vitro unbegrenzt züchten lassen. Da B-Zellen sich nicht über lange Zeit in vitro kultivieren lassen, suchte man nach geeigneten Zellen und stieß dabei auf Antikörper-produzierende B-Zellen von Plasmacytomen. Plasmacytome kommen bei vielen Spezies vor, können aber auch experimentell bei Mäusen induziert werden. Myelomzellen lassen sich kultivieren, klonieren und als relativ stabile Zellkulturlinie halten, mit einer uneingeschränkten Produktion an homogenen Immunglobulinen (LASKOV und SCHARFF, 1970). In der Regel reagierten diese jedoch nicht gezielt mit Antigenen (HABER et al., 1977; POTTER, 1978), so daß es nicht möglich war, Myelomzellen zu erhalten, die Antikörper gegen definierte Antigene produzierten. Intensiv war die Ig-Produktion von Mäusemyelomzellen untersucht worden, HORIBATA und HARRIS (1970) adaptierten vom BALB/c-Myelom MOPC-21 stammende Zellen in vitro und nannten die Zelllinie P3K. KÖHLER und MILSTEIN (1975) verwendeten für ihre ersten Fusionen eine Sublinie davon, P3 - X63-Ag8, die zudem Azaguanin-resistent war und damit die Isolierung der Hybridzellen im Selektivmedium nach dem Prinzip von LITTLEFIELD (1964) ermöglichte. Er hatte Zellen produziert, denen die Enzyme Hypoxanthinribosyltransferase (HGPRT) und Thymidinkinase (TK) fehlten. Mit Hilfe von HGPRT metabolisieren normale Zellen Azaguanin und Bromdesoxyuridin anstelle von Hypoxanthin zu Nukleotiden, die mit zellulären Nukleotiden interferieren und zum Zelltod führen. Durch TK bauen normale Zellen Bromdesoxyuridin anstelle von Thymidin in die DNS ein, was Chromosomenbrüche, Mutationen und die Beeinflussung des Zellwachstums und der Zelldiffe-

renzierung zur Folge hat und ebenfalls zum Zelltod führt. Da LITTLE-FIELDS Zellen die entsprechenden Enzyme fehlten, waren sie Azaguanin- und Bromdesoxyuridinresistent, sie waren aber auch nicht in der Lage, den sog. 'Nebenweg' zur Metabolisierung von Hypoxanthin und Thymidin direkt aus dem Medium zu beschreiten. Er wies dies nach, indem er seine Zellen einem Hypoxanthin-, Aminopterin- und Thymidin-haltigen Medium, dem sog. 'HAT-Selektivmedium', aussetzte. Aminopterin ist ein Folsäureantagonist, der den Hauptweg zur Synthese von Purinen und Pyrimidinen blockiert. Die Zellen starben ab.

Mit der Einführung dieses HAT-Selektivmediums wurde die Isolierung von Hybridomzellen wesentlich erleichtert, denn man verwendet die oben beschriebenen HGPRT⁻ und TK⁻ Myelomzellen, fusioniert sie mit Milzzellen von zuvor immunisierten Mäusen und erhält drei verschiedene Arten von Zellen: 1. nicht fusionierte Milzzellen, 2. nicht fusionierte Myelomzellen und 3. fusionierte Milz-Myelomzellen. Überführt man diese Zellen in HAT-Selektivmedium, so werden nicht nur die Milzzellen, die, wie zuvor beschrieben, in vitro nicht über längere Zeit kultivierbar sind, absterben, sondern auch die nicht fusionierten Myelomzellen, da diese keine Nukleotide metabolisieren können. Allein die fusionierten Zellen überleben, da diesen der Nebenweg zur Nukleotidsynthese über Genome von den Milzzellen zur Verfügung steht.

KÖHLER und MILSTEIN (1975) hatten dieses Selektionsprinzip übernommen und fusionierten jeweils zwei HAT-sensitive Myelomzelllinien mit Milzzellen, deren sezernierte Immunglobuline bekannt waren. Es waren dies die BALB/c-Myelomlinie PIBU1 und die BALB/c-Myelomlinie P3-X63-Ag8. Die HAT-Mediumisolierten Hybride produzierten beide elterlichen sowie ein neues Ig, entstanden durch gemischte Assoziationen der L- und H-Ketten beider Myelomzellpopulationen. SHULMAN et al. (1978) beschrieben, daß aus zufällig assoziierten L- und H-Ketten 10 verschiedene Ig's entstehen können und daß der Anteil an spezifischen Antikörpern dann nur ein 1/16 des gesamten Ig-Anteils ausmacht. Ferner könnten auch ganz neue Antikörper-Spezifitäten auftreten (KÖHLER und MILSTEIN, 1976; KÖHLER et al., 1976; COTTON et al., 1973). Aus diesem Grunde arbeitete man mit Myelomzelllinien weiter,

die kein eigenes Ig mehr sezernierten. KEARNEY et al. (1979) gelang die Isolation des Subklones X63-Ag8.653, der außerdem auch gute Ergebnisse in bezug auf Vermehrungsrate, Fusionsfrequenz und Stabilität aufwies.

Eine weitere Zelllinie, die die gleichen Eigenschaften wie X63-Ag8.653 aufwies, wurde von FAZEKAS DE ST.GROTH und SCHEIDEGGER (1980) isoliert. Die als FO (F für 'Fast growing' und O für 'zero globulin production') bezeichnete Population zeichnete sich besonders durch eine hohe Vermehrungsrate aus. Für Fusionen werden seither hauptsächlich X63-Ag8.653 und FO verwendet.

2.2.2 Faktoren, die die Fusion beeinflussen

Erfolgreiche Fusionen werden von mehreren Faktoren begünstigt. Zunächst ist die Art des Immunogens wichtig, die Fusionsfrequenz liegt bei schwachen Immunogenen wesentlich niedriger (YELTON et al., 1980) als bei starken Immunogenen (KÖHLER und MILSTEIN, 1975; 1976). Die Anwendung verschiedener Immunisierungsprogramme zur Stimulierung der Antikörper-produzierenden B-Zellen stellt einen weiteren Faktor dar. Die Fusionsrate steigt bei hyperimmunisierten Mäusen im Gegensatz zu nicht reimmunisierten Mäusen. Ferner ließ sich das günstigste Zeitintervall zwischen Reimmunisierung und Milzentnahme mit 3 bis 5 Tagen bestimmen (ANDERSON und MELCHERS, 1978; CLAFLIN und WILLIAMS, 1978; KENNETT et al, 1978).

Da das Auftreten von spontanen Fusionen in Zellmischungen sehr gering ist (BARSKI et al., 1961; SORIEUL und EPHRUSSI, 1961), wurden zahlreiche Versuche unternommen, um die Fusionsrate der Zellen zu erhöhen. Sendaviruss, durch UV-Strahlen (HARRIS und WATKINS, 1965) oder Beta-Propiolakton (NEFF und ENDERS, 1968) inaktiviert, galt zunächst als vielversprechender Fusionsvermittler. Technische Schwierigkeiten bei Produktion und Lagerung, Verlust und Unterschiede in der Aktivität und das Nichtansprechen von einigen Zellarten auf dieses Fusogen führten zu weiteren Untersuchungen von

anderen Substanzen. Ca^{++} -Konzentration, pH-Einfluß sowie die Wirkung von verschiedenen Lipidderivaten und Polyäthylenglykol (PEG) wurden getestet, wobei PEG, von PONTECORVO (1975) verwendet, die besten Ergebnisse erbrachte. Obwohl hoch toxisch für die Zellen, konnten DAVIDSON und GERHARD (1976) sowie DAVIDSON et al. (1976) seine Anwendung weitgehend vereinfachen und eine Abhängigkeit seiner Wirkung auf die Zellmembran von der Konzentration, der Einwirkdauer und dem Molekulargewicht zeigen. NORWOOD et al. (1976) versuchten, die starke Abhängigkeit der PEG-Wirkung von der verwendeten Konzentration und der Zeit durch Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) zu verringern. Dabei gingen sie von der Kälte- und Strahlenschutzwirkung für Zellen sowie von der starken Hydrophilie des DMSO (ASHWOOD-SMITH, 1971) und seiner Wirkung auf Schafererythrozyten aus, die eine Neuordnung und Anhäufung zytoplasmatischer Membrankügelchen verursachte (KIRK und TROSTESON, 1973) und sich fördernd auf die Zellfusion auswirkte. NORWOOD (1976) postulierte, daß eine Veränderung der direkten Umgebung der Zytoplasmamembran durch DMSO einen engeren Kontakt der Zelloberfläche mit PEG bewirken könnte sowie durch die Veränderung der Zytoplasmamembran eine Erhöhung der Fusionsrate mit sich brächte. Durch eine einminütige Einwirkzeit von 44 %igem PEG mit einem Molekulargewicht von 6000, dem 10 % DMSO zugefügt war, erhielt er eine größere Anzahl lebender Hybridzellen.

Die Ergebnisse mit Sendaivirus als Fusionsvermittler hatten bei 5 bis 6 Kolonien/ 10^7 Zellen gelegen, bei weiteren Versuchen mit Zellsuspensionen und PEG als Fusogen bewegten sie sich zwischen 1900 und 3000 Kolonien/ 10^7 Zellen. Die Toxizität von PEG konnte durch Arbeiten während und bis 15 Minuten nach der Fusion in Ca^{++} -freiem Medium herabgesetzt werden (SCHEIDEGGER et al., 1979). FAZEKAS DE ST.GROTH und SCHEIDEGGER (1980) bestätigten das von CROCE (1972) beschriebene pH-Optimum bei pH 7,6 - 8,0 zum Teil und verglichen 50 %ige PEG-Konzentration im Ca^{++} -freien Medium mit 5 %-igen und 10 %igen DMSO-Konzentrationen sowie PEG mit Molekulargewichten zwischen 200 und 20 000 von verschiedenen Herstellern. Danach wies PEG 4000 (Merck, Darmstadt) die größte Wirksamkeit

auf, während der Einfluß von 5 %igem oder 10 %igem DMSO unbedeutend zu sein schien.

2.2.3 Faktoren, die die Produktion von monoklonalen Antikörpern beeinflussen

Ein großes Problem bei der Produktion von monoklonalen Antikörpern stellt die Instabilität der Hybride nach der Fusion dar. Fusion von Mäusemyelomzellen mit xenogenen Milzzellen erbrachten wenige Hybride, die außerdem keine stabile Ig-Sekretion zeigten. Das Fehlen der Ig-Produktion in Interspezies-Hybriden wurde auf den Verlust von nicht-murinen Chromosomen zurückgeführt (HENGARTNER et al., 1978). Jedoch wurde auch bei Fusionen mit allogenen Milzzellen zeitweilig ein Verschwinden der Ig-Sekretion beobachtet. Dies hängt mit einem Verlust der Synthese von H- und L-Ketten zusammen, verbunden mit Chromosomen-Verlust (KÖHLER, 1980) und/oder Überwachsen durch nicht-produzierende Klone während der Hybridvermehrung (GERHARD et al., 1978). KÖHLER et al. (1978) schätzen den dabei auftretenden Kettenverlust auf 10 - 20 %. Das Überwachsen von produzierenden durch nicht-produzierende Hybridzellen kann durch alsbaldiges Trennen einzelner Kolonien mittels Klonierung in Agar (COFFINO et al., 1972) oder Endpunktverdünnung (LEFKOVITS, 1972) verringert werden. Weitere, allerdings sehr aufwendige Methoden vermindern ein Überwachsen, indem kleine Volumina mit geringer Zahl fusionierter Zellen auf Mikrotiterplatten verteilt werden (NOWINSKI et al., 1979) oder indem sie sofort in Agar kloniert werden (SHARON et al., 1979).

FAZEKAS DE ST.GROTH und SCHEIDEGGER (1980) haben den Effekt von Peritonealmakrophagen auf die Zellen während der Fusion und der Vermehrungsphase studiert und festgestellt, daß etwa doppelt so viele Hybridome überleben, gibt man ihnen Peritonealmakrophagen als 'feeder layer' zu. Dabei ist die Anzahl, mindestens 2×10^4 /ml, und ihre Herkunft von entscheidender Bedeutung. Es müssen frisch gewonnene Makrophagen sein, keinesfalls etablierte Linien, da diese wiederum die Hybridomkultur überwuchern.

Die Effektivität von schlecht wachsenden Kulturen kann verbessert werden, indem man sie auf kleine Volumina reduziert, die zwar ein höheres Kontaminationsrisiko beinhalten, deren weit höhere Vermehrungsrate dies jedoch wettmacht.

Große Mengen von Antikörpern können im Zellkulturüberstand von Massenkulturen produziert werden, die bis zu 100 µg/ml Antikörper sekretieren (POLLOCK et al., 1984). Die Zellen können aber auch in Mäuse transplantiert werden und bilden dort, wie die elterlichen Myelomzellen, solide Tumoren bei subkutaner und Ascites bei intraperitonealer Applikation (KÖHLER und MILSTEIN, 1976). Voraussetzung dafür ist die immunsuppressive Vorbehandlung der Tiere mit Pristan (2,6,10,14-Tetramethyl-Pentadecan). Das Exsudat enthält bis zu 10 mg/ml Antikörper (POLLOCK et al., 1984). Initial wurden 10^7 Zellen intraperitoneal appliziert und im Exsudat können 100- bis 1000fach höhere Konzentrationen an monoklonalen Antikörpern, verglichen mit dem Zellkulturüberstand, gemessen werden.

2.2.4 Anwendung von monoklonalen Antikörpern

Obwohl mit den zuvor beschriebenen Methoden (Rosettierung, Stimulationstests) die morphologische und funktionelle Differenzierung der Immunzellen und deren Subpopulationen versucht wurde, repräsentieren monoklonale Antikörper das bestgeeignete Werkzeug zur Identifizierung der Zelloberflächenantigene, zum Studium der funktionellen Fähigkeiten dieser Zellen und deren genetischen Determination.

Sie besitzen den Vorteil gegenüber polyklonalen Seren, daß sie immer nur eine antigene Determinante erkennen, wodurch das Studium auch der kleinster Änderung in der Sequenz oder Konformation dieser Determinanten ermöglicht wird. Dies gilt auch, wenn sehr komplexes Antigen verwendet wird, wie z.B. intakte Zellen, Virus-infizierte Zellen oder Zellmembranen. Mit polyvalenten Seren ist dies nicht mit der erforderlichen Genauigkeit möglich und stellt zumindest eine Ursache für die differierenden Ergebnisse verschiedener diagnostischer Laboratorien dar (POLLOCK, 1984).

Monoklonale Antikörper bieten eine Vielfalt an Anwendungsmöglichkeiten für die Diagnostik und die Therapie, bei der Herstellung von Vakzinen sowie bei der Erforschung des Immunsystems. Eine große Anzahl von monoklonalen Antikörpern wurde gegen Viren produziert, wie z.B. gegen Influenza, Hepatitis, Polio, Epstein Barr Virus und Tollwut. Durch ihre hohe Spezifität ist es möglich, Viren wie Herpes simplex Typ I und II voneinander zu unterscheiden (Zusammenfassung s. CAMPBELL, 1984).

Auch für die Diagnose von bakteriellen Infektionen eignen sich monoklonale Antikörper, besonders für solche, die zu starken Kreuzreaktionen mit polyvalenten Seren führen. MORRIS et al. (1985) wiesen mit monoklonalen Antikörpern das Enterotoxin von bestimmten Serotypen von *Escherichia coli* nach, was aufgrund der nahen serologischen Verwandtschaft bisher nicht möglich war, jedoch differentialdiagnostisch von Bedeutung ist. Weiterhin bieten sich parasitologische Untersuchungen an, da hier neben der Diagnose auch der Lebenszyklus der Parasiten miterforscht werden kann. Dies wurde untersucht bei Malaria, Schistosomiasis und Leishmaniose (Zusammenfassung s. CAMPBELL, 1984).

Für diagnostische Zwecke ist es oft notwendig, das Antigen zu reinigen. Oft ist nur während kurzer Zeit und nur in geringen Mengen das pathogene Agens in Läsionen oder im Sekret vorhanden, oder es handelt sich um persistierende Infektionen, bei denen das Antigen zum Nachweis nicht ausreicht oder aber durch Wirtsantikörper gebunden und so nicht für die Untersuchung zugänglich ist. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern kann das Antigen aus einer komplexen Mixtur isoliert und z.B. zur Herstellung von Vakzinen gereinigt werden. Es ist auch möglich, monoklonale Antikörper selbst auf ihre Effektivität zur Herstellung von Vakzinen hin zu prüfen (DAVIS et al., 1985).

Monoklonale Antikörper werden verwendet, um die antigenen Strukturen herauszufinden, die für die Ausbildung einer Immunität verantwortlich sind. Dies wurde z.B. bei Tollwut, Newcastle Disease und beim Influenzavirus vorgenommen (Zusammenfassung s. CAMPBELL, 1984).

POTOCNJAC et al. (1980) immunisierten Mäuse mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen Malaria-Sporozoiten-Antigen gerichtet war, und konnten damit eine Infektion verhindern. Gerade im Hinblick auf die große Zahl der Krankheiten, für die heute noch kein Impfstoff zur Verfügung steht, stellt dies einen wichtigen Anwendungsbereich dar.

Im therapeutischen Bereich können monoklonale Antikörper zur Behandlung von Neoplasien herangezogen werden, z.B., monoklonale Antikörper, die die idiotypische Determinante auf dem IgM von neoplastischen B-Lymphozyten erkennen, oder monoklonale Antikörper, die spezifische Zellantigene auf anderen Neoplasien markieren (VITTETA et al., 1983). Ein breites Forschungsfeld stellt die Aufklärung von Autoimmunerkrankungen sowie die immunologischen Reaktionen bei Transplantationen dar (CAMPBELL, 1984). Bei Infektionen mit *Escherichia coli* ist es möglich, monoklonale Antikörper oral zu applizieren, die mit deren Pili reagieren und damit einen passiven Schutz der Tiere erzeugen (SHERMAN et al., 1983).

2.2.5 Monoklonale Antikörper gegen Differenzierungsantigene von Schweine-lymphozyten

Die Rolle der immunkompetenten Zellen, T- und B-Lymphozyten, ihre Kooperation und genetische Determination ist noch immer wenig erforscht. Gerade hier können monoklonale Antikörper einen wichtigen Beitrag leisten.

DENECKE et al. (1985) untersuchten die unterschiedlichen lymphoretikulären Gewebe des Schweines hinsichtlich ihres Gehaltes an den verschiedenen Lymphozytensubpopulationen mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern. Sie stellten fest, daß die funktionelle Aufteilung des Immunsystems weitgehend mit der anatomischen T- und B-Zellkompartimentierung in den lymphatischen Organen korreliert. MORETTA et al. (1982) gelang die Definition von humanen T-Zellsubpopulationen. Da die Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen nur in geringen Mengen vorkommen, benötigt man dazu eine große Anzahl von Zellen, wie sie nur per Fusion zu gewinnen sind. Gerade im veterinärmedizinischen Bereich besteht ein Bedarf an monoklonalen Antikörpern, die eine schnelle und genaue Darstellung der Lymphozytensubpopulationen erlauben. LEWIN et al. (1985a) legten eine Studie über die Kreuzreak-

tionen von Rinder-, Pferde-, Schaf- und Schweinelymphozyten des peripheren Blutes mit einem humanen monoklonalen Antikörper vor. Sie stellten fest, daß der monoklonale Antikörper im Zusammenhang mit Komplement einen Prozentsatz von Lymphozyten abtötete, der genau dem Anteil an Lymphozyten entsprach, die Oberflächenimmunglobulin enthalten. Sie konnten nachweisen, daß der verwendete monoklonale Antikörper eine Determinante des MHC auf den B-Lymphozyten aller Spezies erkannte. Ferner produzierten LEWIN et al. (1985b) monoklonale Antikörper, die bovine T- und B-Lymphozyten unterscheiden, wobei einer der monoklonalen Antikörper eine Heterogenität unter den T-Zellen erkennt.

Speziell auf dem Gebiet der Immunitätsforschung bei Schweinen arbeiteten PESCOVITZ, LUNNEY und SACHS (1984). Sie immunisierten Mäuse mit Schweinethymozyten. Die entstandenen Hybridomlinien produzierten 26 monoklonale Antikörper, die sie auf ihre Spezifität gegenüber Schweinelymphozytensubpopulationen hin untersuchten. Die Mehrzahl reagierte mit Determinanten auf allen getesteten Lymphozyten und Makrophagen. Einige markierten spezielle MHC-Epitope, andere eine hochmolekulare Peptidkette, die einem auf allen Leukozyten vorkommenden Antigen entspricht. Von speziellem Interesse erwiesen sich 6 monoklonale Antikörper, die mit verschiedenen Subpopulationen der peripheren Blutlymphozyten reagierten. Ein monoklonaler Antikörper markierte periphere B-Zellen und Thrombozyten, jedoch keine T-Zellen, zwei weitere reagierten mit Makrophagen und Granulozyten, der nächste mit T-Zellen, Makrophagen und Granulozyten, jedoch nicht mit B-Zellen und die beiden letzten mit T-Zellen ausschließlich. Bei diesen zwei monoklonalen Antikörpern konnte eine Subpopulationscharakterisierung erfolgen, einer erkennt T-Helferzellen und der andere zytotoxische und/oder Suppressor-T-Zellen.

Auch JONJIC und KOSZINOWSKI (1984) produzierten mit Hilfe von mit Schweinethymuszellen immunisierten Mäusen einen monoklonalen Antikörper, der eine Subpopulation von T-Zellen identifiziert. Das Polypeptid, das der monoklonale Antikörper erkennt, befindet sich auf der Oberfläche von zytolytischen T-Zellen und deren Vorläufern, nicht aber auf anderen T-Zellen und B-Zellen.

Arbeiten, die es erlauben, quantitative Bestimmungen von Zellen des peripheren Blutes anzustellen, deren Oberflächenmembranen IgM tragen, liegen von HOLLINGSHEAD et al. (1985) und PAUL et al. (1985) vor. Sie stellten monoklonale Antikörper her, die mit den schweren Ketten von Schweine-IgM reagieren, alle speziesspezifisch sind und dazu herangezogen werden können, IgM-tragende Zellen aus dem Zellverband herauszufinden sowie IgM im Serum nachzuweisen.

2.2.6 Nachweis von monoklonalen Antikörpern

Um Antikörper, die von Hybridomzelllinien sezerniert werden, nachzuweisen, bedarf es einer empfindlichen und möglichst schnellen Nachweismethode. Weiterhin soll sie eine hohe Spezifität aufweisen und jederzeit reproduzierbar sein.

Enzyme Immuno Assay (EIA) bzw. Enzyme-Linked Immuno Assay (ELISA) und Radio Immuno Assay (RIA) erfüllen diese Bedingungen, und es können darüber hinaus viele Proben gleichzeitig getestet werden. EIA bzw. ELISA und RIA bestehen aus einer Anzahl von Reaktionsschritten in welcher die Immunreagentien an eine feste Phase gebunden werden. Die Verwendung einer festen Phase stützt sich auf die Beobachtung, daß sich Proteine leicht an bestimmte Plastikoberflächen heften, wie z.B. Polyvinylchloride, aus denen Mikrotiterplatten hergestellt sind (YOLKEN, 1985). Am gebräuchlichsten ist die Bindung des Antigens an die Plastikoberfläche und die Zugabe des zu testenden Antikörpers. An diesen Antigen-Antikörper-Komplex wird im Verlauf des Testes ein zweiter, enzymgekoppelter (EIA/ELISA) oder radioaktivmarkierter (RIA) Antikörper gebunden und durch Zugabe von Substrat (EIA/ELISA) oder direkt (RIA) gemessen (YOLKEN, 1982).

Eine weitere Methode zum Nachweis von spezifischen Antikörpern ist die Hämagglutination. Bei der Hämagglutination werden Antikörper gegen die verschiedenen Antigene der Erythrozytenmembran nachgewiesen, die durch die Antikörper-Antigen-Reaktion die Erythrozyten lysieren oder sichtbar verklumpen. Es ist jedoch

auch möglich, die Erythrozyten in Antigenträger umzuwandeln, indem an ihrer Oberfläche fremde Antigene gebunden werden, die die Erythrozyten agglutinierbar machen. Diese Methode bezeichnet man als passive Hämagglutination. In diesem Fall reagieren die Antikörper nicht mit den natürlichen Erythrozytendeterminanten, sondern mit den gekoppelten Antigenen, und die Erythrozyten zeigen die Antikörper-Antigen-Reaktion nur passiv als Hämagglutination an (TUCKER und WRIGHT, 1982).

Eine Methode, die die Topographie der Immunreaktion am biologischen Objekt zeigen kann, ist die Immunhistologie. Die Lokalisierung des Antikörper-Antigen-Präzipitats wird durch die Markierung der spezifischen Immunglobuline bzw. der Antigene mit einem UV-empfindlichen Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Fluoreszenz reicht eine geringe Anzahl von Farbstoffmolekülen pro Proteinmolekül aus, wobei die Beladung zu keiner wesentlichen Änderung der physikochemischen und immunreaktiven Eigenschaften führt. Man unterscheidet prinzipiell zwei Methoden: beim direkten Test wird das fluoreszenzmarkierte Ig direkt an die zu untersuchenden Antikörper gebunden, und beim indirekten Test werden die Antikörper zunächst mit unmarkiertem Ig beladen, welches dann zusätzlich markiertes Anti-Ig fixiert. Häufig verwandt wird Fluoresceinisothiocyanat (FITC), das ein leuchtend grünes Fluoreszenzlicht ausstrahlt. Als andersfarbige Alternative bietet sich orange-rot fluoreszierendes Rhodamin-B-200-Isothiocyanat an, wodurch auch die gleichzeitige Anwendung von verschiedenfarbigen Fluoreszenzfarbstoffen auf einem Objekt zur Darstellung unterschiedlicher Antigene ermöglicht wird (ERNST, 1980).

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

Wachstumsmedium: Minimal Essential Medium nach EARLE (MEM)
(Fa. Biochrom, Berlin)

Zusätze:

1. Antibiotika

100 IE/ml Penicillin (Hoechst, Frankfurt)

100 µl/ml Streptomycin (Grünthal, Stolberg)

2,5 µl/ml Amphotericin B (V. Heyden, München)

100 µl/ml Neomycin (Bycomycin^R, Byk Gulden,
Konstanz)

2. Vitaminlösung (MEM IV)

3. Puffer NaHCO_3 , pH 7,6

4. Foetales Kälberserum (FKS) (Boehringer, Mannheim)

5. Selektivmedien

Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin (HAT)

(50x) (Behring, Marburg)

Azaguanin (50x) (Behring, Marburg)

Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

8,0 g NaCl pH 7,4

0,2 g KCl

1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

0,2 g KH_2PO_4

0,1 g CaCl_2

0,1 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ ad 1 l A. bidest

Natrium-Phosphat-Puffer (NaCl-P-P)

8,0 g NaCl

0,2 g KH_2PO_4

2,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$

0,2 g KCl ad 1 l A. bidest

Tween 20 (Merck, München)

Bovines Serumalbumin (BSA) (Behring, Marburg)

Dimethylsulfoxyd (DMSO) (Merck, München)

Lysing Reagenz

8,26	g	NH_4Cl	
1,09	g	NaHCO_3	
0,037	g	EDTA-Triplex III	ad 1 l A. bidest

gesättigte Ammoniumsulfatlösung

654,0	g	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	ad 1 l A. bidest
-------	---	------------------------------	------------------

3.2 Herstellung von monoklonalen Antikörpern

3.2.1 Antigen-Herstellung

Als Antigen dienten Schweinelymphozyten, die aus heparinisierten Schlachthofblutproben gewonnen wurden. Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte mittels Ficoll (Fa. Biochrom, Berlin) als Trennlösung. Dazu wurde gepooltes Schweineblut 1:1 mit PBS verdünnt, vorsichtig über die gleiche Menge Ficoll geschichtet und 30 Min. lang bei 500 g zentrifugiert. Die sich bildende Interphase wurde abgesaugt und gewaschen. Die Erythrozyten wurden mittels Lysing-Reagenz lysiert. Dafür wurde das Reagenz ca. 5 Min. einwirken gelassen, mit PBS verdünnt und 10 Min. bei 500 g zentrifugiert. In einer Zählkammer nach Thoma wurden die Schweinelymphozyten auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

3.2.2 Immunisierung von Mäusen

Zur Immunisierung wurden ausschließlich 8 bis 12 Wochen alte BALB/c Mäuse verwendet. Alle Mäuse wurden 2- bis 4mal im Abstand von 2 bis 4 Wochen mit 2×10^7 Lymphozyten in 0,5 ml PBS i.p. immunisiert. Jeweils 4 Tage nach der letzten Antigengabe erfolgte sowohl die Entnahme der Milz für die Fusion als auch die Blutentnahme aus der Vena hepatica zur Bestimmung des Antikörpertiters. Aus dem Blut wurde Serum gewonnen, das im weiteren als Fusionsmausserum (FMS) bezeichnet wird.

3.2.3 Kultivierung von Myelomzellen

Alle Fusionen wurden mit einem Subklon der Mäusemyelomzelllinie P3-X63-Ag8. durchgeführt, der von KEARNEY et al. (1979) isoliert und als X63-Ag8.653 bezeichnet wurde. Der Subklon ist, wie die Elternzelllinie Hypoxanthinphosphoribosyltransferase-negativ (HGPRT⁻), synthetisiert jedoch weder die γ -Ketten noch die χ -Ketten der Elternlinie.

X63-Ag8.653-Zellen wurden in 500 ml-Zellkulturflaschen (Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg) in einem mit 5 % CO₂ begasten Brutschrank bei 37 °C in MEM/20%FKS vermehrt. Alle 2 bis 3 Tage wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um die im Überstand schwimmenden Zellen zu eliminieren, und die adhärennten Zellen wurden auf 2 Flaschen verteilt. Damit erreichte man, daß nur die adhärennt wachsenden Zellen zur Fusion kamen, da solche Zellen im weiteren Fortgang der Untersuchungen leichter zu handhaben sind.

Um sicherzustellen, daß die Mäusemyelomzellen auch tatsächlich HGPRT⁻ reagierten, wurden Proben von ihnen kurz vor der Fusion Azaguanin-bzw. HAT-Medium ausgesetzt.

3.2.4 Zellfusion

Die in dieser Arbeit verwendete Technik der Zellfusion wurde nach der Methode von BACHMANN (pers. Mitteilung) durchgeführt.

Aufbereitung der Milz: Nach Tötung einer immunisierten BALB/c-Maus in Äther-Narkose erfolgte die Entnahme der Milz unter sterilen Bedingungen. Unter Zugabe von serumfreiem (sf) MEM wurde die Milz auf einem Drahtnetz (Porenweite 0,5 mm, Fa. Patazzi & May, Schlüchtern) zerrieben. Die gewonnene Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen dekantiert und für 2 bis 5 Min. stehengelassen, bis sich die größeren Partikel abgesetzt hatten, bevor der Überstand in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt und 8 Min. bei 500 g zentrifugiert

wurde. Daran anschließend wurden die Zellen im Sediment in 10 ml sf-MEM resuspendiert und nach einer Vitalfärbung mit Trypanblau in einer Zählkammer nach Thoma gezählt.

Vorbereitung der Myelomzellen: Die Myelomzellen wurden ca. 2 Wochen vor der geplanten Fusion im MEM/20%FKS in Kultur gebracht. Zur Fusion wurden die Zellen aus 2 bis 3 500 ml-Flaschen zentrifugiert (8 Min. bei 500 g), in 10 ml sf-MEM resuspendiert und gezählt.

Fusion: Myelomzellen und Milzzellen wurden im Verhältnis 1:5 gemischt und 10 Min. bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde sehr sorgfältig abgesaugt. Auf das Zellsediment wurde 1 ml PEG 4000 (Fa. Merck, Darmstadt) gegeben und sehr sorgfältig resuspendiert. Nach 1 Min. wurde das PEG tropfenweise mit 20 ml sf-MEM ausverdünnt und die Zellen anschließend 6 Min. bei 200 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte die Resuspension der Zellen in HAT-Medium/20%FKS und die Überführung in eine Zellkulturflasche. Zur Stabilisierung der fusionierten Zellen erfolgte eine Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre für 12 Std. Die Hybridomzellen wurden mit HAT/20%FKS auf eine Endkonzentration von 10⁵ bis 10⁶/ml gebracht. Auf Linbroplatten wurden je 5x10⁴/ml Peritonealmakrophagen pro Loch (s. 3.2.5.) in 1 ml HAT-Medium/20%FKS (feeder layer) vorgegeben und die Hybridomzellen zu je 1 ml pro Loch verteilt. Die Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Am 10. Tag nach der Fusion konnte das HAT-Medium/20%FKS mit MEM/20%FKS 1:1 ausverdünnt werden, da bis zu diesem Zeitpunkt die nicht fusionierten Myelom- und Milzzellen abgestorben waren.

Ca. 2 bis 3 Wochen nach der Fusion waren die Zellkolonien makroskopisch sichtbar und konnten mit Hilfe einer Mikropipette einzeln aufgesaugt und auf eine weitere Linbroplatte mit vorgegebenen Peritonealmakrophagen übertragen werden.

3.2.5 Kultivierung von Hybridomzellen

Nach einer Fusion wurden die Zellen unter Vorgabe von Peritonealmakrophagen auf Linbroplatten verteilt. Die Fusionsrate erhöhte sich um ein Vielfaches durch den Einsatz von Peritonealmakrophagen als sog. feeder layer. Sie wurden ebenfalls bei der Limiting Dilution und bei schlecht wachsenden Zelllinien eingesetzt. Dabei ist die Art der Peritonealmakrophagen von entscheidender Bedeutung; es müssen frisch gewonnene Makrophagen sein (FAZEKAS DE ST.GROTH und SCHEIDEGGER, 1980).

Sie wurden gewonnen, indem man einer frisch getöteten Maus 5 ml einer 11,6 %igen Saccharoselösung i.p. applizierte, für eine gute Verteilung sorgte und ca. 10 Min. einwirken ließ. Nach dieser Zeit wurde die Zuckerlösung wieder abgesaugt und 15 Min. bei 750 g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit MEM/20%FKS gewaschen und auf eine Konzentration von 5×10^5 /ml in dem gleichen Medium eingestellt.

Von den Linbroplatten wurden die fusionierten Zellen schrittweise, je nach Beurteilung ihrer Wachstumsrate, zunächst auf 2 Löcher der Linbroplatte verteilt und dann auf 40 ml-Zellkulturflaschen (Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg) gebracht. Vor jedem Verdünnungsschritt wurden die Zellkulturüberstände auf ihren Gehalt an Antikörpern überprüft und gegebenenfalls die negativen Zelllinien verworfen. Sie wurden solange bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, bis sie den Eindruck einer stabilen, zum Einfrieren oder zur Klonierung geeigneten Kultur machten.

3.2.6 Klonierung

Die Hybridomklonierung wurde mittels Limiting Dilution (LD) durchgeführt. Das bedeutet, daß die Zellsuspension so verdünnt wird, daß möglichst nur 1 Zelle in ein Loch kommt. Damit ist gewährleistet, daß die sich dort vermehrenden Zellen alle von einer Elternzelle abstammen und die daraus resultierenden Antikörper somit monoklonale Antikörper sind.

Zu diesem Zweck wurden zunächst Mikrotiterplatten (Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg) mit je 100 μ l Peritonealmakrophagen (5×10^4 /ml) beschickt und inkubiert. Die Hybridomzellsuspension wurde mittels einer Verdünnungsreihe auf 4×10^2 bzw. $0,8 \times 10^2$ Zellen/ml eingestellt, so daß eine Hälfte der Mikrotiterplatte mit 4 Zellen/200 μ l/Loch und die andere Hälfte der Platte mit je 0,8 Zellen/200 μ l/Loch beschickt werden konnte. Für 10 bis 14 Tage wurden die Platten dann möglichst erschütterungsfrei inkubiert.

Nach Ablauf dieser Frist wurden die Platten unter dem Mikroskop durchgemustert und in einem Protokoll die Löcher markiert, in denen sich nur ein Klon vermehrte. Sobald ein solcher Klon makroskopisch sichtbar war, wurde er auf seine Produktion von monoklonalen Antikörpern getestet. Dabei interessierte nur ein plus/minus-Ergebnis. Die negativen Klone wurden verworfen, die positiven, sobald sie dicht gewachsen waren, mit Hilfe einer Mikropipette auf eine Linbroplatte übertragen. Oft wurden den Zellen in diesem Stadium noch Peritonealmakrophagen zugegeben.

Je nach Teilungsrate konnten die Zellen von der Linbroplatte über 40 ml-Zellkulturflaschen auf 100 ml- und schließlich auf 500 ml-Flaschen gebracht werden. Vor jedem dieser Vermehrungsschritte wurde die Antikörperproduktion überprüft.

3.2.7 Einfrieren und Auftauen von Hybridomzelllinien

War eine 500 ml fassende Zellkulturflasche dichtgewachsen, so konnten diese Zellen entweder sofort in Mäuse injiziert oder aber aus zeitlichen und technischen Gründen eingefroren werden.

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst 10 Min. lang bei 500 g sedimentiert, der Überstand für weitere Tests gewonnen und die Zellen in MEM/20%FKS/5%DMSO aufgenommen. Sie wurden in Portionen zu 1 ml und in einer Konzentration von nicht mehr als 2×10^7 /ml für 2 Std. bei 4 °C aufbewahrt, dann für 24 Std. auf -20 °C gekühlt und

schließlich in flüssigem Stickstoff bei -183°C konserviert. Zum Auftauen wurden die Zellen rasch über den Gefrierpunkt gebracht, 2mal gewaschen (5 Min., 500 g) und in Wachstumsmedium resuspendiert. Zur weiteren Vermehrung wurden sie entweder auf Linbroplatten pipettiert oder direkt in Mäuse injiziert.

3.2.8 Produktion von Hybridomzellen in Mäusen

Die Myelomzelllinie X63-Ag8.653 bewirkt, an Mäuse i.p. verabreicht, die Ausbildung von Ascites, in dem sich die Zellen vermehren. Zur Ascitesproduktion wurden erwachsene BALB/c-Mäuse herangezogen. Sie wurden 12 bis 14 Tage zuvor mit je 1 ml Pristan (2,6,10,14-Tetramethyl-Pentadecan; Fa. Aldrich, Steinheim) i.p. behandelt. Man verabreichte ihnen je 1 ml Hybridomzellen in einer Konzentration zwischen 10^6 und $10^7/\text{ml}$ i.p. Dabei wurde immer 2 Mäusen die gleiche Zelllinie appliziert.

Nach 4 bis 10 Tagen konnte das Exsudat gewonnen werden. Es wurden 2 Methoden angewandt: Für die meisten Versuche wurden die Mäuse getötet, die Bauchhöhle vorsichtig eröffnet und das Exsudat mittels einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt. Die andere Methode ist nach BRODEUR et al. (1984) modifiziert. Danach wurde mit einer 4 mm Kanüle die Bauchhöhle bereits nach 4 Tagen punktiert, wenn eine Fluktuation tastbar war. Es konnte alle 2 bis 3 Tage punktiert werden, im Schnitt bis zu dreimal.

Das Exsudat wurde 5 Min. bei 400 g zentrifugiert. Das Hybridomzellsediment konnte in MEM aufgenommen und für die Gewinnung von serumfreiem Überstand in Zellkulturflaschen eingebracht werden. Der Exsudat-Überstand wurde erneut 30 Min. bei 2000 g zentrifugiert und bei 4°C aufbewahrt.

3.3 Nachweis der gegen Schweinelymphozyten gerichteten monoklonalen Antikörper

Der Nachweis wurde während der gesamten Produktionsphase mittels Enzym-Linked Immunosorbent Assay's (ELISA) geführt. Die Gewinnung des Antigens (Isolierung der Schweinelymphozyten) erfolgte wie in Punkt 3.2.1 beschrieben.

Beschichtung der Platten: Als Reaktionsgefäße dienten Immunolon-Platten (MI29A von Dynatech, Plochingen), die mit je 100 µl Poly-L-Lysin (Sigma, 1:50 in PBS)/Loch beschichtet und 30 Min. bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen wurden. Anschließend wurden sie gut ausgeschlagen, mit je 100 µl ficollierten Schweinelymphozyten in einer Konzentration von 5×10^6 /ml beschichtet und 5 Min. lang bei 1250 g zentrifugiert. Danach wurden je 100 µl 0,5 %iges Glutaraldehyd (25 %iges von Merck, Darmstadt; 1:50 in kalter PBS) zugefügt. Es folgte eine Inkubation für 15 Min. bei RT, bevor zweimal mit PBS gewaschen wurde. Jetzt wurden je 200 µl NaCl mit 1 % BSA und 100 mmol/l Glycin (Fa. Merck, Darmstadt) in die Löcher pipettiert und 30 Min. bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte als letzter Schritt die Beschichtung mit je 200 µl NaCl mit 1 % BSA und eine Inkubation für 30 Min. bei RT. Mit einer Folie abgedeckt wurden die Platten bei -20 °C aufbewahrt.

Test: Die vorbereiteten ELISA-Platten mußten aufgetaut und zunächst dreimal mit NaCl-P-P/0,05 % Tween gewaschen werden. Anschließend wurden je 100 µl monoklonale Antikörper (meist Zellkulturüberstände) in die Löcher pipettiert. Eine Reihe, die als Leerwert diente, wurde nur mit MEM/20%FKS beschickt, und in eine Reihe wurde als definierter Antikörper (Vergleichswert) Fusionsmausserum (s. Kap. 3.2.2) in einer Verdünnungsreihe mit MEM/20%FKS von 1:40 bis 1:5000 pipettiert. Ferner wurden auf allen Platten einige Löcher mit Zellkulturüberständen von parentalen Myelomzellen (X63-Ag8.653) als Kontrolle bestückt. Die abgedeckten Platten wurden 1 Std. lang bei 37 °C leicht geschüttelt, 3mal mit NaCl-P-P/0,05% Tween gewaschen und nach der Zugabe von je 100 µl Konjugat (GAM/Ig/PO, Fa. Nordic

Immunology, Tilburg, Niederlande; 1:3000 in NaCl-P-P/5%FKS) wiederum für 45 Min. bei 37 °C inkubiert. Danach wurde 3mal gewaschen und je 100 µl Substrat (Wasserstoffperoxyd, Fa. Merck, Darmstadt, 1:1000 verdünnt in einer Indikatorlösung bestehend aus 0,5 g ortho-Phenyldiamin/l folgenden Pufferes: 1,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 0,19 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,37 g EDTA auf 1 l Aqua dest.) in die Löcher gefüllt. Nach einem erneuten 20minütigen Schütteln bei RT konnte die Extinktion bei 450 nm gemessen werden.

3.4 Reinigung der monoklonalen Antikörper

3.4.1 Ammoniumsulfatfällung

Zur Reinigung und um das Volumen der Zellkulturüberstände bzw. der Exsudate einzuengen, wurden die Proben mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt und anschließend dialysiert.

Die Zellkulturüberstände bzw. Exsudate wurden mit dem gleichen Volumen Ammoniumsulfatlösung versetzt und 1/2 Std. bei 4 °C stehen gelassen. Die ausgefällten Proteine wurden dann 20 Min. lang bei 1250 g zentrifugiert und in 1 ml NaCl-P-P gelöst. Anschließend wurden sie entweder in Dialyseschläuche (2 cm, Fa. Serva, Heidelberg) gefüllt und 2mal 8 Std. bei 4 °C gegen NaCl-P-P dialysiert oder über eine Sephadex-G25-Säule (Fa. Pharmacia, Freiburg) entsalzt. Letztere Methode eignet sich besonders für eine geringe Anzahl von Proben mit einem kleinen Volumen. 2,5 ml Proteinlösung wurden auf die Säule gegeben und mit 3,5 ml NaCl-P-P eluiert.

3.4.2 Protein-A-Affinitätschromatographie

Bei der Protein-A-Affinitätschromatographie handelt es sich um ein Verfahren, das auf der Bindung des Staphylococcus aureus-Proteins (SPA) an die Fc-Fragmente von Immunglobulinen basiert (FORSGREN und SJOQUIST, 1966). SPA reagiert mit allen Immunglobulinen von

Warmblütern (KRONVALL et al., 1970a), jedoch unterschiedlich stark. Die im Rahmen dieser Arbeit interessierende Bindung mit Mäuseserum bezieht sich nur auf IgG2a, IgG2b und IgG3. IgG1 wird schlecht gebunden (KRONVALL et al., 1970c; CHALON et al., 1979). Daraus ergibt sich die Möglichkeit der Reinigung mit Hilfe der Protein-A-Affinitätschromatographie nur für Immunglobuline der IgG-Klasse, wobei IgG1 ebenfalls ausscheidet.

Die eigentliche Säule bestand aus Protein-A-Sepharose 4B (Fa. Pharmacia, Freiburg). Von dieser ließ man 2,5 g/5 ml 10 Min. lang im Waschpuffer A (0,05 mol/l TRIS-HCl, pH 8,5; 0,15 mol NaCl; 0,002 % Thimerosal, Fa. Sigma, München) quellen und füllte sie in eine 5 ml-Säule (Glas- oder Tröpfelpipette). Nachdem sie mindestens mit dem sechsfachen Säulenvolumen mit Waschpuffer A equilibriert war (6 bis 8 Std.), wurden die 3 bis 7 ml gefällten Zellüberstände bzw. 1 bis 3 ml Ascites-Exsudate mit einer Flußrate von ca. 0,5 ml/Min. aufgetragen. Die Säule wurde mit weiteren 6 Volumina Puffer A gewaschen, bis die Transmission auf dem Schreiber wieder dem Ausgangswert entsprach. Dann wurde mit dem Elutionspuffer B (0,1 mol/l Glycin-HCl, pH 3,0; 0,002 % Thimerosal, Fa. Sigma, München) eluiert. Die Fraktion, die dem aufgezeichneten Peak entsprach, wurde gesondert aufgefangen und bei 4 °C aufbewahrt.

3.5 Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern

3.5.1 Bestimmung der Immunglobulinklassen und -subklassen

Die Bestimmung erfolgte mittels ELISA. Die Immunolonplatten (M129A, Fa. Dynatech, Plochingen) wurden beschichtet mit Goat-Anti-Mouse-Immunglobulin (GAM/Ig; Fa. Sigma, München), in Coating-Puffer (Karbonat-Bicarbonatpuffer, pH 9,6) verdünnt. Dabei wurden für die Klassenbestimmung GAM/IgG, GAM/IgA, GAM/IgM und GAM/IgG(Fc) in der Verdünnung 1:250 und für die Subklassenbestimmung bei GAM/IgG1 1:1000, GAM/IgG2a 1:1800 und GAM/IgG2b sowie GAM/IgG3 1:3000 verwendet. GAM/IgG(Fc) wurde verwendet, da es eine noch größere Sicherheit in der Erkennung der IgG-Klasse bietet; dies erschien angebracht, da die als IgG charakterisierten monoklonalen

Antikörper anschließend mit Hilfe der Protein-A-Affinitätschromatographie gereinigt werden sollten. Als Kontrolle verwendete man Coating-Puffer.

Zur Beschichtung wurden 100 µl/Loch pipettiert, die Platten mit einer Folie abgedeckt, 3 Std. bei 37 °C inkubiert und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Am Testtag wurden sie 3mal mit NaCl-P-P/0,05 % Tween gewaschen, mit je 100 µl BSA (1 %ig in NaCl-P-P/0,05 % Tween)/Loch beschickt und 1 Std. lang bei 37 °C geschüttelt. Die weiteren Reaktionsschritte entsprachen denen des unter 3.3 beschriebenen ELISA.

3.5.2 Mercaptoäthanol-Behandlung

Die Behandlung mit Mercaptoäthanol (ME) wurde bei allen Zellkulturüberständen vorgenommen, die als IgM reagierten. Zu diesem Zweck wurde zu einem Volumen Zellkulturüberstand ein Volumen ME (2-Mercaptoäthanol 0,1 mol/l in 0,1 mol/l NaCl + 0,1 mol/l TRIS-Puffer, Fa. Serva, Heidelberg) zugesetzt und 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Volumen Jodacetamid (0,01 mol/l in NaCl-TRIS-Puffer, Fa. Serva, Heidelberg) zugegeben und weitere 10 Min. bei RT inkubiert. Es ist zu berücksichtigen, daß eine 1:3-Verdünnung der Probe stattfindet. Die so behandelten Zellkulturüberstände wurden in Dialysehschläuche (2 cm, Fa. Serva, Heidelberg) gefüllt und über Nacht bei 4 °C gegen 0,8 % NaCl-Lösung dialysiert.

3.5.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde modifiziert nach LOWRY et al. (1951) durchgeführt. Es waren 4 Stammlösungen erforderlich:

1. Kupfersulfatlösung (1 %)
2. Natriumtartratlösung (2 %)
3. Natriumcarbonatlösung (2 %)
4. Folin-Ciocaltes Phenolreagenz

Aus den Stammlösungen wurden die Reagenzien A und B hergestellt. Reagenz A setzt sich aus 5 ml Natriumcarbonatlösung und 50 µl Natriumtartratlösung und 50 µl Kupfersulfatlösung zusammen. Als Reagenz B diente Folin-Ciocaltes Phenolreagenz (1:1,5 verdünnt in A. dest., Fa. Merck, Darmstadt). Als Standard diente gereinigtes Maus-IgG in Verdünnungen von 1:2 bis 1:40. Die zu untersuchenden Proben wurden 1:10 bzw. 1:100 verdünnt. Von jeder Standard- sowie Probenverdünnung wurden je 100 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert, dann je 500 µl der Reagenz A zugesetzt, durch Schütteln gut gemischt und 10 Min. stehengelassen. Dann wurden 50 µl der Reagenz B hinzupipettiert, wiederum geschüttelt und mindestens 30 Min. einwirken gelassen. Nach dem Umfüllen von je 300 µl jeder Probe und jedes Standards in 2 Löcher einer Mikrotiterplatte (Fa. Dynatech, Plochingen) erfolgte sofort die Absorptionsmessung bei 510 nm mit A. dest. als Leerwert. Mit den Ergebnissen der Standardverdünnungen konnte eine Eichkurve erstellt werden.

3.5.4 Titerbestimmung

Die Titerbestimmung der monoklonalen Antikörper wurde mittels ELISA, wie unter 3.3 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden zur Untersuchung die mit Ammoniumsulfat gefällten Zellkulturüberstände bzw. die Protein-A-Eluate herangezogen. Es wurde eine Verdünnungsreihe in logarithmischen Zweierschritten hergestellt und gemessen.

3.5.5 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung der monoklonalen Antikörper-Proteine erfolgte in dem von LÄMMLI (1970) entwickelten diskontinuierlichen Puffersystem unter reduzierenden Bedingungen. Das Gel wurde nach folgendem Schema gegossen:

1. Sockelgel

- 2,0 ml Acryl-Bisacrylamid 30 (AA) (Fa. Biorad, München)
(0,8 w/V in H₂O)
- 3,75 ml Trenngelpuffer (TRIS-HCl 3 mol/l, pH 8,8)
- 0,15 ml Ammoniumperoxidsulfat (AMPER) (Fa. Merck, Darmstadt) (1,5 % in H₂O)
- 0,45 ml A. dest.
- 15 µl TEMED (Fa. Biorad, München)

2. Trenngel (10 %ig)

- 10,0 ml AA
- 3,75 ml Trenngelpuffer Stammlösung (TRIS-HCl 3 mol/l, pH 8,8)
- 0,15 ml AMPER
- 14,45 ml A. dest.
- 15 µl TEMED

3. Sammelgel

- 2,5 ml AA
- 5,0 ml Sammelgelpuffer Stammlösung (TRIS-HCl 0,5 mol/l, pH 6,8)
- 0,1 ml AMPER
- 11,3 ml A. dest.
- 15 µl TEMED

Die Proben wurden 1:4 mit loading buffer (10 % SDS (w/v), 10 % (v/v) Beta-Mercaptoäthanol, Fa. Biorad, München; 50 % Sucrose (w/v), 0,005 % Bromphenolblau, Fa. Biorad, München) gemischt und 3 bis 5 Min. im Wasserbad gekocht. Nach dem Abkühlen und Einfüllen der Proben in die Taschen lief die Elektrophorese (Elektrophoresepuffer 0,02 mol/l TRIS, 0,192 mol/l Glycin, 0,1 % SDS) 16 Std. lang mit 50 V in einer Elektrophoreseapparatur nach STUDIER (1973).

Die Darstellung erfolgte mittels Silberfärbung (alle Substanzen für die Färbung von Fa. Merck, Darmstadt). Hierzu wurden die Gele 30 Min. lang in 50 % Methanol mit 12 % Eisessig fixiert und anschließend

3mal in 10 % Methanol mit 5 % Eisessig gewaschen. Oxidiert wurde mit 25 ml Kaliumdichromat (34 mmol/l) und 60 µl Salpetersäure in 250 ml H₂O. Viermaliges Waschen in A. dest. und 30 Min. Inkubation in der Silbernitratlösung (0,02 % in H₂O) schloß sich an. Nach erneutem Waschen in A. dest. wurden die Banden in Natriumcarbonat (0,28 mol/l) mit Formalin (1 ml/l) entwickelt. Sobald sie deutlich erkennbar waren, beendete man den Entwicklungsvorgang durch Absaugen der Lösung und Zugabe von 1 % Essigsäure. Nach kurzem Einwirken wurde die Säure durch A. dest. ersetzt. Das Gel wurde fotografiert und im Gelrockner (Fa. Zabona, Basel) auf einem passend zugeschnittenen Filterpapier getrocknet.

3.5.6 Differenzierung mittels Immunfluoreszenz

Die Differenzierung der monoklonalen Antikörper wurde mit Hilfe eines Laser-Cytofluorographen (Spektrum III, Ortho Diagnostic System, Westwood, MA, USA) durchgeführt. Dabei wurde die Bindung der monoklonalen Antikörper an Lymphozyten, Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten sowie Milz- und Thymuszellen mit Hilfe eines zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörpers (GAM/mIg/FITC) (Fa. Nordic Immunology, Tilburg, Niederlande) dargestellt.

Gewinnung der Zellen: Die Lymphozyten wurden durch Ficollierung, wie in Kap. 3.2.1 beschrieben, separiert. Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten konnten aus einer gepoolten Schweineblutprobe isoliert werden. Durch Zentrifugation für 10 Min. bei 200 g bildeten sich drei Phasen: Plasma mit Thrombozyten als Überstand, Buffy coat mit Leukozyten und ein Sediment aus Erythrozyten. Der Überstand wurde erneut 10 Min. bei 3000 g zentrifugiert, das Plasma verworfen und das Pellet in PBS mit 100 µl Heparin (Heparin-Natrium-Salz, Fa. Roth, Karlsruhe) resuspendiert. Anschließend wurde dieses Pellet aus Thrombozyten noch zweimal mit PBS/Heparin durch Zentrifugieren für 10 Min. bei 3000 g gewaschen.

Die Gewinnung von Granulozyten und Lymphozyten aus dem Buffy coat erfolgte durch Lysis der Erythrozyten mit Lysing Reagenz und zweimaligem Waschen mit PBS. Die Erythrozyten wurden in PBS resuspendiert und zweimal gewaschen.

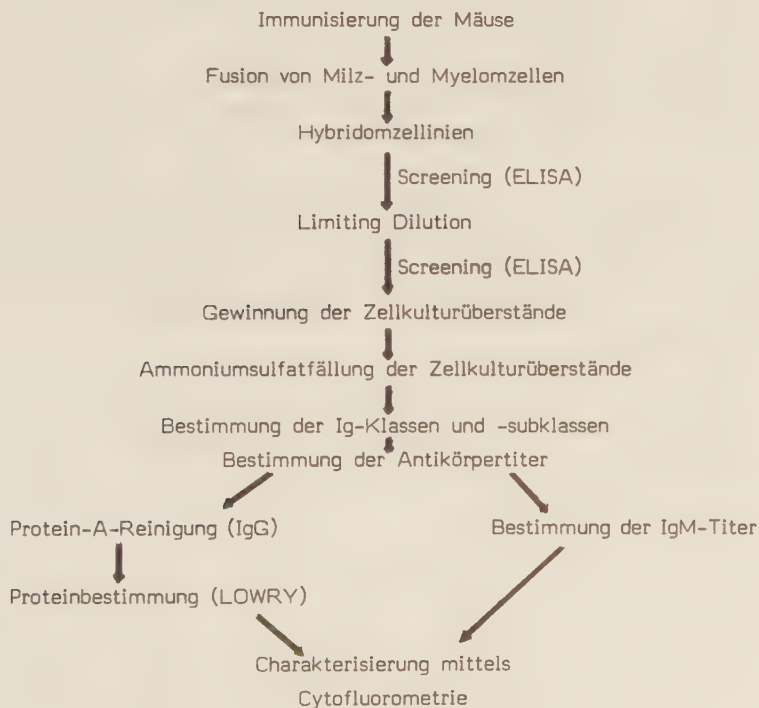
Zur Gewinnung der Thymus- bzw. Milzzellen wurde Thymus- bzw. Milzgewebe von frisch geschlachteten Ferkeln zerkleinert, auf einem Drahtnetz über einer Petrischale mit PBS zerrieben, durch einen Gazefilter gegeben und anschließend 10 Min. bei 700 g zentrifugiert.

Alle Zellsuspensionen wurden in PBS ohne Ca/Mg und mit 1 % BSA/2%FKS/0,2%Natriumazid aufgenommen und auf $2,5 \times 10^6$ /ml eingestellt. Zu je 200 μ l der entsprechenden Zellsuspension wurden je 100 μ l monoklonale Antikörper zugegeben. Für den Null-Wert wurde anstelle der monoklonalen Antikörper MEM/20%FKS, für die Negativ-Kontrolle Zellkulturüberstand von der Myelomzelllinie X63-Ag8.653 und für die Positiv-Kontrolle Fusionsmausserum in einer Verdünnung von 1:20 eingesetzt. Die Proben wurden gründlich gemischt und 1/2 Std. auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS ohne Ca/Mg (10 Min. bei 400 g) wurden je 100 μ l FITC-markierter Sekundärantikörper (1:20 in PBS ohne Ca/Mg mit BSA/FKS/Natriumazid) zugesetzt, ein negativer Kontrollansatz ohne Konjugat diente als Eichprobe für den Cytofluorographen. Die Proben wurden erneut gut gemischt und 1/2 Std. auf Eis inkubiert. Überschüssiges Konjugat wurde durch zweimaliges Waschen entfernt, die Proben mit je 1 ml PBS ohne Ca/Mg resuspendiert und bis zur Messung auf Eis und im Dunkeln aufbewahrt.

4. Versuche und Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper gegen Antigene von Schweinelymphozyten produziert. Sie wurden hinsichtlich ihrer Immunglobulinklassen- und -subklassen charakterisiert. Ferner wurde der Proteingehalt (IgG) nach LOWRY und ihr Antikörper-Titer im Zell-ELISA (IgM) bestimmt. Die gewonnenen monoklonalen Antikörper wurden dann auf ihre spezifische Bindungsfähigkeit an peripheren Lymphozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Erythrozyten, Thymus- und Milzzellen hin untersucht.

Das Flußdiagramm gibt einen Überblick über die einzelnen Untersuchungsschritte:



4.1 Vergleich der Immunisierungsschemata

Zur Produktion der monoklonalen Antikörper wurden verschiedene Immunisierungsschemata von Mäusen angewandt, die in Tab. 1 aufgeführt sind. Von jeder zur Fusion herangezogenen Maus wurde Serum (FMS) gewonnen und im Zell-ELISA der Antikörpertiter bestimmt.

Tab. 1: Immunisierungsschemata I - VI

	1. Reimmunisierung nach	2. Reimmunisierung nach
I	2 Wochen	-
II	3 Wochen	-
III	4 Wochen	-
IV	2 Wochen	1 Woche
V	2 Wochen	2 Wochen
VI	4 Wochen	1 Woche

Die Reimmunisierung erfolgte nach den in Tab. 1 angegebenen Zeiten. Die Fusion bzw. die Gewinnung des Serums erfolgte jeweils 4 Tage nach der letzten Immunisierung, da die antigeninduzierte B-Zellproliferation zu diesem Zeitpunkt am höchsten ist (KLEINSCHMIDT, pers. Mitteilung).

Wie aus Tab. 2 (s. S. 44) zu ersehen ist, wies das Immunisierungsschema VI den höchsten Titer auf, weswegen es für die folgenden Fusionen herangezogen wurde.

Tab. 2: Gemessene Antikörpertiter im Zell-ELISA.

Als positiv wurden alle Extinktionswerte bei 450 nm > 0,1 angesehen.

Immunisierung	Titer	
I	1 :	8.000
II	1 :	160.000
III	1 :	18.000
IV	1 :	450.000
V	1 :	65.000
VI	1 :	4.500.000

4.2 Ausbeute an Hybridomlinien

Die Ausbeute an Hybridomlinien aus den Fusionen war sehr unterschiedlich. In Tab. 3 sind die Hybridomlinien mit konstanter monoklonaler Antikörperproduktion und gutem Wachstum, die aus einer Fusion gewonnen wurden, aufgelistet.

Tab. 3: Anzahl der etablierten Hybridomzelllinien/Fusion

Fusion Nr.	Hybridomlinien n
1	4
2	0
3	0
4	33
5	86
6	9
7	4
8	0
9	0
10	10
11	0
12	0
13	0
14	0
15	3

Wie sich aus Tab. 3 ersehen läßt, schwanken die Ergebnisse der unter gleichen Bedingungen durchgeführten Fusionen sehr stark. Die Fusionen Nr. 4 und Nr. 5 erwiesen sich bezüglich der Ausbeute an Kolonien als sehr erfolgreich, dem stehen 8 Fusionen gegenüber, bei denen die Hybridomzelllinien im Verlauf der Kultivierung entweder das Wachstum oder die Antikörperproduktion einstellten.

Über den Verlauf von Fusionen gibt Tab. 4 am Beispiel von Fusion Nr. 1 und Nr. 5 einen Überblick.

Tab. 4: Verlauf der Fusionen Nr. 1 und Nr. 5

LD = Limiting dilution

	Fusion Nr. 1	Fusion Nr. 5
Zahl der nach der Fusion beschichteten Linbroplatten	10	10
Zahl der Löcher, die nach 2 Wochen wachsende Kolonien enthielten	192	175
Zahl der davon im ELISA positiven Kolonien:		
- gut wachsende Kolonien	17	30
- schlecht wachsende Kolonien	13	33
- Kolonien, die das Wachstum einstellten	57	45
Zahl der zur LD herangezogenen Kolonien	15	44
Ausbeute an Klonen nach LD:		
- mit gutem Wachstum und Antikörperproduktion	2	18
- Wachstum und/oder Antikörperproduktion eingestellt	13	26

Wie Tab. 4 zeigt, variiert die Ausbeute an Hybridomlinien bei gleichen Fusions- und Kultivierungsbedingungen sehr stark. Bei Fusion Nr. 1 waren 2 Klonierungen und bei Fusion Nr. 5 18 Klonierungen gelungen.

Von einer LD-Platte wurden meist mehrere Klone gewonnen, deren Bezeichnung für Fusion Nr. 1 und Nr. 5 in Tab. aufgeführt wird.

Tab. 5: Bezeichnung der etablierten Hybridomlinien aus den Fusionen Nr. 1 und Nr. 5

Fusions-Nr.	Kolonie	Klon
1	12 V 8	.4, .7
	12 V 9	.1, .2
5	16 V 15	.2, .5, .6, .7, .8, .9, .10, .13
	16 V 20	.3
	16 V 22	.2, .5, .7, .8, .10, .11
	16 V 23	.2, .4, .6, .8
	16 V 24	.2, .3, .4, .5, .6, .7, .8, .9, .11, .15, .19, .20, .21, .24, .25
	16 V 25	.1, .2, .4
	16 V 26	.1, .2, .4, .5, .7, .8, .9, .10
	16 V 33	.3, .4, .5, .6, .7, .9, .12, .15, .17
	16 V 40	.10
	16 V 41	.1, .5, .6
	16 V 44	.1
	16 V 83	.10, .15
	16 V 88	.1, .4, .6, .10
	16 V 94	.7, .13
	16 V 97	.1, .2, .3, .5, .7, .8
	16 V107	.3, .9, .11
	16 V108	.1, .8
	16 V 6	.2

Wie aus Tab. 5 zu ersehen ist, setzt sich die genaue Bezeichnung einer Hybridzelllinie aus Kolonie- und Klon-Ziffer zusammen, z.B. 12V8.4, 16V15.2. Diese Zahlenfolge gilt ebenfalls als Bezeichnung für den monoklonalen Antikörper, den diese Hybridzelllinie produziert.

4.3 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

Von den 147 gewonnenen Hybridzelllinien wurden 68 stabile Klone, d.h. gut wachsende Klone mit einer stabilen Antikörperproduktion, ausgewählt. Die weiteren Untersuchungen wurden mit den monoklonalen Antikörpern dieser Linien durchgeführt.

4.3.1 Bestimmung der Immunglobulinklassen und -subklassen

Für die weiteren Untersuchungen, insbesondere für die sich anschließenden Reinigungsschritte, war es von Interesse, die monoklonalen Antikörper hinsichtlich ihrer Immunglobulinklassen und -subklassen zu charakterisieren.

Tab. 6: Immunglobulinklassen bzw. -subklassenzuordnung der monoklonalen Antikörper

MAK	IgA	IgM	IgG			
			IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
12V8.4		+				
12V9.1			+			
15V28.2			+			
16V6.9					+	
16V22.10			+			
16V23.2			+			
16V24.2			+			
16V25.1			+			
16V83.15			+			
16V88.6			+			
16V107.11			+			
15V17.2		+				
15V18.2		+				
15V18.3		+				
15V18.7		+				
15V20.1		+				
15V23.5		+				
15V23.9		+				
15V25.1		+				
15V25.2		+				
15V25.5		+				

Fortsetzung Tab. 6:

MAK	IgA	IgM	IgG			
			IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
15V50.1		+				
15V50.7		+				
16V15.5			+			
16V15.10			+			
16V20.2		+				
16V20.3		+				
16V26.2		+				
16V26.7		+				
16V26.8		+				
16V29.9		+				
16V33.4		+				
16V33.12		+				
16V40.10		+				
16V41.1			+			
16V41.6			+			
16V44.1			+			
16V94.7		+				
16V97.1		+				
16V97.2		+				
16V97.8		+				
16V108.8			+			
15V15.1		+				
17V2.1				+(?)	+(?)	
17V6.1		+				
17V13.1			+			
17V13.2			+			
17V14.1			+			
17V14.2			+			
17V14.3			+			
17V14.4			+			
17V14.5			+			
18V19.1			+			
18V4.2		+				
18V4.2		+				
18V4.3		+				
21V7.1		+				
21V7.2		+				
21V7.3		+				
21V7.4		+				
21V7.5		+				
21V7.6		+				
21V7.7		+				
21V38.1			+			
21V38.4			+			
21V38.9			+			
26V13.10			+			
26V13.17			+			

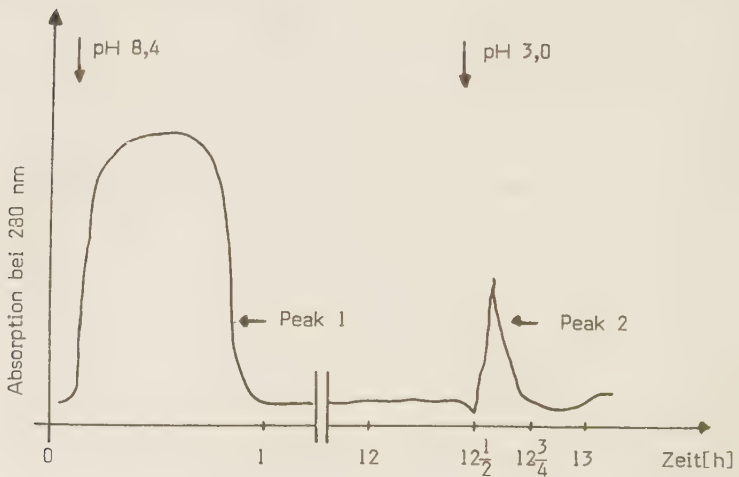
Besonders bei den monoklonalen Antikörpern, die der Immunglobulin-klasse M angehören, traten oft falsch positive Ergebnisse im IgG-ELISA auf. Ferner konnte der monoklonale Antikörper 17V2.1 nicht eindeutig einer Ig-Subklasse zugeordnet werden.

4.3.1.1 Immunglobulinklassen und -subklassen und deren Reinigung

Die monoklonalen Antikörper, die sich als IgG erwiesen hatten, wurden mit Hilfe der Protein-A-Affinitätschromatographie gereinigt. Hierbei zeigten monoklonale Antikörper, die zur Subklasse IgG1 gehören, eine unterschiedlich starke Affinität zu Protein A, was die Ergebnisse von KRONVALL et al. (1979a) und CHALON et al. (1979) bestätigte, wonach IgG1 schlecht gebunden wird.

Abb. 1 zeigt als Beispiel die Absorptionskurve bei 280 nm von 17V14.4.

Abb. 1: Absorptionskurve von 17V14.4



Bei der in Abb. 1 dargestellten Kurve entspricht Peak 1 dem Proteinanteil, der nicht von Protein A bei pH 8,4 gebunden wird (hauptsächlich Albumin). Peak 2 stellt die IgG-Fraktion dar, die im folgenden als Protein-A-Eluat bezeichnet wird.

4.3.1.2 Extinktionswerte nach Mercaptoäthanol-Behandlung

Zur Vertiefung der Ergebnisse der IgM-Klassenbestimmung aus Tab. 6 wurden die monoklonalen Antikörper der IgM-Klasse mit Mercaptoäthanol (ME) behandelt. Zur Kontrolle wurde ein monoklonaler Antikörper der IgG-Klasse ebenfalls behandelt und getestet.

Tab. 7: Vergleich von monoklonalen Antikörpern vor und nach ME-Behandlung im Zell-ELISA (E = 450 nm)
K = Kontrolle (IgG)

MAK	Extinktionswerte	
	unbehandelt	ME-behandelt
12V8.4	1,0	0
12V17.2	1,1	0,5
15V18.2	0,9	0
15V18.3	0,7	0
15V18.7	0,9	0
15V20.1	0,5	0
15V23.5	0,9	0
15V23.9	0,9	0
15V25.1	0,8	0
15V25.2	0,9	0
15V25.5	0,7	0
15V50.1	0,6	0
15V50.7	0,7	0
16V20.2	0,2	0
16V20.3	0,1	0
16V26.2	0,2	0
16V26.7	0,1	0
16V26.8	0,1	0
16V26.9	0,1	0
16V33.4	0,6	0,1
16V33.12	0,6	0,1
16V40.10	0,2	0,1
16V94.7	0,3	0
16V97.1	0,4	0,1
16V97.2	0,3	0

Fortsetzung Tab. 7:

MAK	Extinktionswerte	
	unbehandelt	ME-behandelt
16V97.8	0,3	0
16V15.1	0,7	0
17V6.1	0,1	0
18V4.1	1,0	0
18V4.2	0,3	0
18V4.3	1,0	0
21V7.1	0,7	0
21V7.2	0,4	0
21V7.3	0,6	0,4
21V7.4	0,4	0
21V7.5	0,3	0,2
21V7.6	0,7	0
21V7.7	0,4	0
17V2.1 K	0,6	0,6

Die monoklonalen Antikörper in Tab. 7 zeigten sich deutlich ME-sensitiv durch ihren Extinktionsabfall im Zell-ELISA nach der ME-Behandlung; der Kontrollwert blieb unverändert.

4.3.2 Bestimmung der Antikörpertiter

4.3.2.1 Titerbestimmung im Zellkulturüberstand

Die Titerbestimmung wurde im Zell-ELISA bei allen 68 ausgesuchten monoklonalen Antikörpern vorgenommen. Für die Titerbestimmung wurden die Ammoniumsulfat-gefällten Zellkulturüberstände herangezogen. Als positiv wurden alle Extinktionswerte bei 450 nm > 0,1 angesehen, da Extinktionswerte bis 0,1 dem "Background", bestehend aus Mediumbestandteilen (Foetales Kälberserum) zuzurechnen sind.

Tab. 8: Antikörpertiter von 68 ausgesuchten monoklonalen Antikörpern im ammoniumsulfatgefällten Zellkulturüberstand

MAK	Titer	MAK	Titer
12V8.4	1 : 1.024	16V41.6	1 : 640
12V9.1	1 : 640	16V44.1	1 : 10.240
15V28.2	1 : 256	16V94.7	1 : 128
16V6.9	1 : 5.120	16V97.1	1 : 512
16V22.10	1 : 128	16V97.2	1 : 256
16V23.2	1 : 32	16V97.8	1 : 128
16V24.2	1 : 32	16V108.8	1 : 256
16V25.1	1 : 512	15V15.1	1 : 4.096
16V83.15	1 : 320	17V2.1	1 : 320
16V88.6	1 : 64	17V6.1	1 : 2
16V107.11	1 : 256	17V13.1	1 : 1.024
15V17.2	1 : 1.024	17V13.2	1 : 512
15V18.2	1 : 1.024	17V14.1	1 : 160
15V18.3	1 : 32	17V14.2	1 : 160
15V18.7	1 : 1.280	17V14.3	1 : 80
15V20.1	1 : 256	17V14.4	1 : 80
15V23.5	1 : 64	17V14.5	1 : 320
15V23.9	1 : 128	18V19.1	1 : 256
15V25.1	1 : 40	18V4.1	1 : 8
15V25.2	1 : 2.560	18V4.2	1 : 4
15V15.5	1 : 512	18V4.3	1 : 4.096
15V50.1	1 : 512	21V7.1	1 : 1.024
15V50.7	1 : 512	21V7.2	1 : 8
16V15.5	1 : 1.280	21V7.3	1 : 32
16V15.10	1 : 10.240	21V7.4	1 : 1.024
16V20.2	1 : 512	21V7.5	1 : 32
16V20.3	1 : 1.024	21V7.6	1 : 256
16V26.2	1 : 80	21V7.7	1 : 64
16V26.7	1 : 512	21V38.1	1 : 2
16V26.8	1 : 256	21V38.4	1 : 2
16V26.9	1 : 20	21V38.9	1 : 2
16V33.4	1 : 1.024	26V13.10	1 : 2
16V33.12	1 : 512	26V13.17	1 : 2
16V40.10	1 : 512		
16V41.1	1 : 64		

Es wurden Titer zwischen 1:2 und 1:10.240 erreicht. Einen Einfluß insbesondere auf die Titerhöhe hat der Zeitpunkt, an dem die Zellkulturüberstände gewonnen werden. Der optimale Zeitpunkt, d.h. die maximale Antikörperkonzentration ist dann erreicht, wenn die Zellen bereits absterben. Aus technischen Gründen jedoch und weil die Zellen erhalten werden sollten, erfolgte die Gewinnung der Überstände, wenn die Zellen zum Einfrieren separiert wurden.

4.3.2.2 Vergleich der Titer im Zellkulturüberstand und im Exsudat

Zur Ascites-Produktion und damit der Gewinnung von Exsudat wurden 6 Hybridomzelllinien ausgewählt. Es handelte sich um IgG-monoklonale Antikörper (vgl. Tab.6), die somit der Protein-A-Reinigung zugänglich waren. Die gereinigten monoklonalen Antikörper aus Zellkulturüberstand und Exsudat wurden im Zell-ELISA miteinander verglichen.

Tab. 9: I = Antikörpertiter im Protein-A-Eluat von Zellkultur-
überstand (um den Faktor 10 - 20 konzentriert)
II = Antikörpertiter im Protein-A-Eluat von Exsudat
(um den Faktor 1 - 5 verdünnt)

MAK	I		II	
17V13.2	1 :	512	1 :	512
17V14.1	1 :	2.048	1 :	4.096
17V14.2	1 :	2.560	1 :	1.024
17V14.3	1 :	1.024	1 :	1.024
17V14.4	1 :	2.048	1 :	8.192
21V38.9	1 :	128	1 :	12

Um die Titerangaben aus Tab. 9 annäherungsweise vergleichen zu können, wurden die Werte unter Berücksichtigung der Konzentrations- bzw. Verdünnungsstufen umgerechnet (siehe Tab. 10, S. 54).

Tab. 10: I = errechneter Antikörpertiter im Zellkulturüberstand
II = errechneter Antikörpertiter im Exsudat

MAK	I	II
17V13.2	1 : 51	1 : 2.560
17V14.1	1 : 204	1 : 20.480
17V14.2	1 : 256	1 : 5.120
17V14.3	1 : 102	1 : 5.120
17V14.4	1 : 204	1 : 40.960
21V38.9	1 : 12	1 : 60

Wie aus den Tabellen 9 und 10 hervorgeht, konnten im Exsudat 5 - 200mal höhere Antikörper-Titer nachgewiesen werden. Die Steigerung der Werte läßt sich durch die starke Konzentrierung der Zellen und die optimalen Wachstumsbedingungen in der Bauchhöhle begründen.

4.3.3 Bestimmung der Antikörperkonzentration und IgM-Titer

Um die Konzentration der monoklonalen Antikörper einer Immunglobulinklasse im Zellkulturüberstand bzw. Exsudat vergleichen zu können, wurden zwei Methoden herangezogen. Für monoklonale Antikörper der IgG-Klasse, die als Protein-A-Eluat vorlagen, wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Bei monoklonalen Antikörpern der IgM-Klasse konnte nur anhand der IgM-Titerbestimmung im IgM-ELISA ein annähernder Vergleich erfolgen, da diese nicht als Protein-A-Eluat vorlagen.

4.3.3.1 Proteinbestimmung

Die direkte Proteinbestimmung nach LOWRY ist nur bei IgG-monoklonalen Antikörpern durchgeführt worden, die als Protein-A-Eluat vorlagen. Bei den Eluaten kann davon ausgegangen werden, daß der gemessene Proteinanteil dem Immunglobulinanteil entspricht.

Tab. 11: Proteinkonzentration in den Eluaten bezogen auf 1 ml Zellkulturüberstand

MAK	µg Protein/ml Zellkulturüberstand
17V2.1	18,1
17V13.2	18,0
17V14.1	5,7
17V14.2	12,2
17V14.3	1,6
17V14.4	9,8
17V14.5	7,5
21V38.1	31,9
21V38.4	21,9
21V38.9	6,1
26V13.10	7,5
26V13.17	7,3
16V6.9	9,2
16V15.5	2,5
16V15.10	5,5
16V23.2	26,4
16V44.1	7,9
16V83.15	11,7

Mit sechs ausgewählten Zelllinien wurden Asciten in Mäusen produziert und auch diese Exsudate über die Protein-A-Säule gereinigt. Die Eluate konnten ebenfalls zur direkten Proteinbestimmung herangezogen werden und mit den Werten der jeweiligen Zellkulturüberstände verglichen werden.

Tab. 12: Proteinkonzentration der Protein-A-Eluate bezogen auf 1 ml Zellkulturüberstand bzw. auf 1 ml Exsudat

MAK	µg Protein/ml Zellkulturüberstand	µg Protein/ml Exsudat
17V13.2	18,0	2.630
17V14.1	5,7	900
17V14.2	12,2	450
17V14.3	1,6	788
17V14.4	9,8	800
21V38.9	6,1	167

Wie aus Tab. 12 hervorgeht und aus den Tabellen 9 und 10 zu erwarten war, lagen die Proteinkonzentrationen im Exsudat 27 - 144mal höher als im Zellkulturüberstand.

4.3.3.2 Ermittlung der IgM-Titer

Da die monoklonalen Antikörper der IgM-Klasse nicht von dem unspezifischen Proteinanteil des Mediums getrennt werden konnten, wurde hier der IgM-Verdünnungstiter im IgM-ELISA bestimmt.

Tab. 13: Titer der IgM-monoklonalen Antikörper im IgM-ELISA mit FMS (Fusionsmausserum) als Kontrolle
Als positiv wurden alle Extinktionswerte bei 450 nm > 0,1 angesehen.

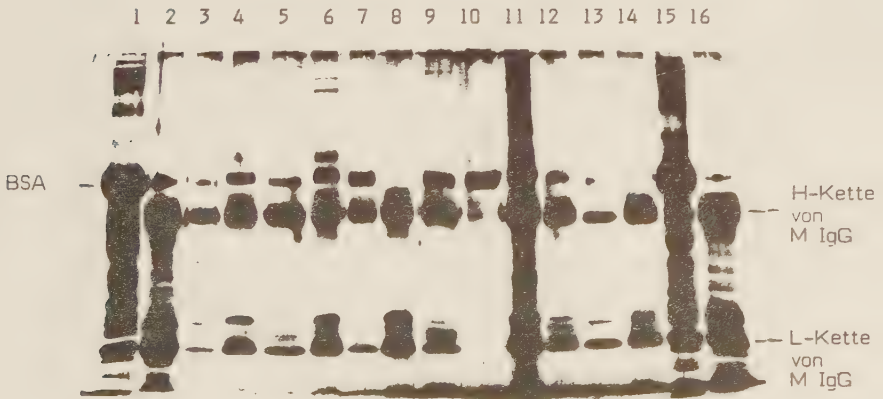
MAK	IgM-Titer	MAK	IgM-Titer
12V8.4	1 : 1,25x2 ¹³	16V33.4	1 : 1x2 ¹²
15V17.2	1 : 1,25x2 ²	16V33.12	1 : 1x2 ¹¹
15V18.2	1 : 1,25x2 ¹²	16V40.10	1 : 1x2 ¹²
15V18.3	1 : 1,25x2 ¹⁰	16V94.7	1 : 1x2 ¹⁸
15V18.7	1 : 1,25x2 ¹³	16V97.1	1 : 1,25x2 ¹³
15V20.1	1 : 1,25x2 ¹³	16V97.2	1 : 1,25x2 ¹³
15V23.5	1 : 1,25x2 ¹¹	16V97.8	1 : 1,25x2 ¹³
15V23.9	1 : 1,25x2 ¹³	15V15.1	1 : 1,25x2 ¹³
15V25.1	1 : 1,25x2 ¹³	17V6.1	1 : 1,25x2 ⁵
15V25.2	1 : 1,25x2 ¹³	18V4.1	1 : 1,25x2 ¹³
15V25.5	1 : 1,25x2 ¹²	18V4.2	1 : 1,25x2 ⁵
15V50.1	1 : 1,25x2 ¹³	18V4.3	1 : 1x2 ¹⁵
15V50.7	1 : 1,25x2 ¹³	21V7.1	1 : 1,25x2 ¹³
16V20.2	1 : 1x2 ¹³	21V7.2	1 : 1,25x2 ¹³
16V20.3	1 : 1x2 ¹¹	21V7.3	1 : 1,25x2 ¹³
16V26.2	1 : 1x2 ¹⁷	21V7.4	1 : 1,25x2 ¹⁰
16V26.7	1 : 1x2 ¹⁷	21V7.5	1 : 1,25x2 ⁸
16V26.8	1 : 1x2 ¹⁷	21V7.6	1 : 1x2 ¹⁵
16V26.9	1 : 1x2 ¹⁴	21V7.7	1 : 1,25x2 ¹³
		FMS	1 : 1x2 ¹⁶

4.3.4. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Das SDS-Gel (Abb. 2) zeigt, daß die Reinigung eines Zellkulturüberstandes über Protein A erfolgreicher als die eines Exsudats verlief. Dies ist vermutlich auf die weitaus größere "Kontamination" des Exsudats mit Maus-Proteinen zurückzuführen. Bei den Markern (BSA, MIgG) wird deutlich sichtbar, daß es sich hierbei keineswegs um reine Präparationen handelte. Alle Protein-A-Eluate enthalten noch Spuren von Albumin, was auf eine Überladung oder Überalterung der Säule hinweist.

Abb. 2: Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (reduziert) mit Protein-A-Eluaten

Bahn 1: BSA (Behring)	9: 17V14.4 (Zellkulturüberstand)
2: MIgG (Sigma)	11: 17V14.4 (Ascites)
3: 17V14.1 (Zellkulturüberstand)	10: 17V14.4 (Zellkulturüberstand)
4: 17V14.1 (Ascites)	12: 17V14.4 (Ascites)
5: 17V14.2 (Zellkulturüberstand)	13: 21V38.9 (Zellkulturüberstand)
6: 17V14.2 (Ascites)	14: 21V38.9 (Ascites)
7: 17V14.3 (Zellkulturüberstand)	15: BSA
8: 17V14.3 (Ascites)	16: MIgG



4.3.5 Differenzierung mittels Cytofluorometrie

Mit Hilfe der Cytofluorometrie wurden die hergestellten monoklonalen Antikörper hinsichtlich ihres spezifischen Bindungsvermögens untersucht. Es wurde getestet, inwieweit sie in der Lage sind, verschiedene Zellen zu unterscheiden. Hierzu wurden die entsprechenden Zellen mit den monoklonalen Antikörpern und einem zweiten Fluoreszenzantikörper markiert. Im Cytofluorographen konnte dann der Anteil markierter Zellantikörper - Komplexe an der Gesamtzellzahl gemessen werden. Nacheinander wurden Lymphozyten des peripheren Blutes, Thrombozyten, Granulozyten, Erythrozyten, Thymus- und Milzzellen mit dieser Methode untersucht.

Über die Ergebnisse mit markierten peripheren Blutlymphozyten (PBL) gibt Tab. 14 Aufschluß.

Tab. 14: Anteil der von den einzelnen monoklonalen Antikörpern spezifisch markierten peripheren Blutlymphozyten (PBL)

+ : 0,1 - 10 % der untersuchten Zellen
 2+ : 11 - 40 % der untersuchten Zellen
 3+ : 41 - 70 % der untersuchten Zellen
 4+ : 71 - 100 % der untersuchten Zellen

MAK	PBL	MAK	PBL
12V8.4	+	16V41.1	2+
12V9.1	4+	16V41.6	+
15V28.2	+	16V44.1	+
16V6.9	4+	16V94.7	+
16V22.10	4+	16V97.1	+
16V23.2	3+	16V97.2	+
16V24.2	3+	16V97.8	2+
16V25.1	3+	16V108.8	+
16V83.15	2+	15V15.1	+
16V88.6	+	17V2.1	+
16V107.11	3+	17V6.1	+
15V17.2	4+	17V13.1	+
15V18.2	+	17V13.2	2+
15V18.3	+	17V14.1	2+
15V18.7	+	17V14.2	2+
15V20.1	2+	17V14.3	+
15V23.5	+	17V14.4	2+
15V23.9	+	17V14.5	2+
15V25.1	+	18V19.1	2+
15V25.2	+	18V4.1	+
15V25.5	+	18V4.2	+
15V50.1	4+	18V4.3	+
15V50.7	3+	21V7.1	+
16V15.5	2+	21V7.2	+
16V15.10	2+	21V7.3	+
16V20.2	+	21V7.4	+
16V20.3	+	21V7.5	+
16V26.2	+	21V7.6	+
16V26.7	+	21V7.7	+
16V26.8	+	21V38.1	2+
16V26.9	+	21V38.4	2+
16V33.4	+	21V38.9	2+
16V33.12	+	21V13.10	2+
16V40.10	+	26V13.17	+

Wie aus Tab. 14 zu ersehen ist , gingen alle 68 monoklonale Antikörper mit den Lymphozyten des peripheren Blutes Bindungen ein. Der überwiegende Anteil, 42 monoklonale Antikörper, markierte zwischen 0,1 und 10 %, 16 monoklonale Antikörper erkannten Epitope auf 11 bis 40 %, 5 monoklonale Antikörper banden zwischen 41 und 70 % und weitere 5 monoklonale Antikörper markierten zwischen 71 und 100 % der Lymphozyten.

Im folgenden wurde untersucht, ob die monoklonalen Antikörper allgemein mit Zellen des Blutes reagierten oder ob sie zwischen den Blutzellen unterscheiden konnten. In Tab. 15 sind die Ergebnisse mit Thrombozyten, Granulozyten und Erythrozyten wiedergegeben.

Tab. 15: Anteil der von den einzelnen monoklonalen Antikörpern spezifisch markierten Thrombozyten, Granulozyten und Erythrozyten

Thrombozyten:

0 : 0 % der untersuchten Zellen
 + : 0,1 - 20 % der untersuchten Zellen
 2+ : 21 - 40 % der untersuchten Zellen
 3+ : 41 - 60 % der untersuchten Zellen

Granulozyten und Erythrozyten:

0 : 0 % der untersuchten Zellen
 + : 0,1 - 10 % der untersuchten Zellen
 2+ : 11 - 40 % der untersuchten Zellen
 3+ : 41 - 70 % der untersuchten Zellen
 4+ : 71 - 100 % der untersuchten Zellen

MAK	Thrombozyten	Granulozyten	Erythrozyten
12V8.4	0	0	0
12V9.1	0	3+	0
15V28.2	0	0	0
16V6.9	0	3+	0
16V22.10	0	0	0
16V23.2	0	0	0
16V24.2	0	0	0
16V25.1	0	0	0
16V83.15	0	0	0
16V88.6	0	0	0
16V107.11	0	0	0
15V17.2	0	0	0
15V18.2	0	0	0
15V18.3	0	0	0
15V18.7	0	0	0
15V20.1	0	4+	0
15V23.5	0	0	0
15V23.9	0	0	0
15V25.1	0	0	0
15V25.2	0	0	0
15V25.5	0	0	0
15V50.1	0	2+	0
15V50.7	0	2+	0
16V15.5	3+	0	0
16V15.10	3+	0	0
16V20.2	0	4+	0
16V20.3	0	4+	0
16V26.2	0	0	0
16V26.7	0	0	0
16V26.8	0	0	0
16V26.9	0	0	0
16V33.4	0	0	0
16V33.12	0	0	0
16V40.10	0	4+	0

Fortsetzung Tab. 15:

MAK	Thrombozyten	Granulozyten	Erythrozyten
16V41.1	0	0	0
16V41.6	0	0	0
16V44.1	0	0	0
16V94.7	0	0	0
16V97.1	0	4+	0
16V97.2	0	4+	0
16V97.8	0	4+	0
16V108.8	0	0	0
15V15.1	+	0	0
17V2.1	2+	0	0
17V6.1	0	2+	0
17V13.1	0	0	0
17V13.2	0	0	0
17V14.1	2+	+	0
17V14.2	2+	2+	0
17V14.3	2+	+	0
17V14.4	2+	2+	0
17V14.5	2+	+	0
18V19.1	+	0	0
18V4.1	0	0	0
18V4.2	0	0	0
18V4.3	0	0	0
21V7.1	0	0	0
21V7.2	0	0	0
21V7.3	0	0	0
21V7.4	0	0	0
21V7.5	0	0	0
21V7.6	0	0	0
21V7.7	0	0	0
21V38.1	+	0	0
21V38.4	+	0	0
21V38.9	+	+	0
26V13.10	+	0	0
26V13.17	0	0	0

In Tab. 15 ist angegeben, welche monoklonalen Antikörper Determinanten auf Thrombozyten bzw. auf Granulozyten erkennen. Keiner der untersuchten monoklonalen Antikörper markierte Erythrozyten.

Die meisten der untersuchten monoklonalen Antikörper, nämlich 54, markierten keine Thrombozyten, 6 monoklonale Antikörper erkannten zwischen 0,1 und 20 %, weitere 6 monoklonale Antikörper markierten 21

bis 40 % und 2 monoklonale Antikörper markierten zwischen 41 und 60 % der Thrombozyten. Auch Granulozyten wurden von dem größten Teil, 50 monoklonale Antikörper, nicht erkannt, 4 monoklonale Antikörper markierten zwischen 0,1 und 10 %, 5 erkannten zwischen 11 und 40 %, 2 bis 70 % und 7 monoklonale Antikörper erkannten Epitope auf 71 bis 100 % der Granulozyten.

Weitere Untersuchungen wurden mit Thymus- und Milzzellen durchgeführt, deren Ergebnisse in Tab. 16 wiedergegeben sind.

Tab. 16: Anteil der von den einzelnen monoklonalen Antikörpern spezifisch markierten Thymus- und Milzzellen

0 : 0 % der untersuchten Zellen
 + : 0,1 - 10 % der untersuchten Zellen
 2+ : 11 - 40 % der untersuchten Zellen

MAK	Thymuszellen	Milzzellen
12V8.4	+	0
12V9.1	2+	+
15V28.2	+	0
16V6.9	2+	+
16V22.10	+	0
16V23.2	2+	0
16V24.2	+	0
16V25.1	+	0
16V83.15	+	0
16V88.6	+	0
16V107.11	+	0
15V17.2	2+	+
15V18.2	+	0
15V18.3	+	+
15V18.7	+	+
15V20.1	+	+
15V23.5	+	+
15V23.9	+	+
15V25.1	+	0
15V25.2	+	0
15V25.5	+	0
15V50.1	2+	2+
15V50.7	2+	+
16V15.5	+	0
16V15.10	+	0
16V20.2	+	0
16V20.3	+	0
16V26.2	+	0

Fortsetzung Tab. 16:

MAK	Thymuszellen	Milzzellen
16V26.7	+	0
16V26.8	+	0
16V26.9	0	0
16V33.4	+	0
16V33.12	+	0
16V40.10	+	0
16V41.1	+	0
16V41.6	+	0
16V44.1	+	0
16V41.6	+	0
16V94.7	+	0
16V97.1	+	0
16V97.2	+	+
16V97.8	+	+
16V108.8	+	0
15V15.1	+	0
17V2.1	+	0
17V6.1	+	0
17V13.1	+	0
17V13.2	+	0
17V14.1	+	0
17V14.2	+	0
17V14.3	+	0
17V14.4	+	0
17V14.5	+	0
18V19.1	+	0
18V4.1	+	0
18V4.2	+	0
18V4.3	+	0
21V7.1	+	+
21V7.2	+	0
21V7.3	+	0
21V7.4	+	0
21V7.5	+	0
21V7.6	+	0
21V7.7	+	0
21V38.1	2+	0
21V38.4	+	+
21V38.9	+	0
26V13.10	+	0
26V13.17	+	0

Aus Tab. 16 geht hervor, welche der untersuchten monoklonalen Antikörper Determinanten auf Thymuszellen und/oder Milzzellen erkannten bzw. keine dieser Zellen erkannten. Der überwiegende Anteil der monoklonalen Antikörper markierte zwischen 0,1 und 10 % der Thymuszellen und 7 monoklonale Antikörper erkannten 11 bis 40 %. Ein monoklonaler Antikörper markierte weder Thymus- noch Milzzellen. Insgesamt markierten 54 monoklonale Antikörper keine Milzzellen, 13 erkannten zwischen 0,1 und 10 % und 1 monoklonaler Antikörper erkannten 11 bis 40 %. Es lassen sich zwei Gruppen unterscheiden: 10 monoklonale Antikörper erkannten Thymus- und Milzzellen in gleichem Maß, 9 davon zwischen 0,1 und 10 % und 1 monoklonaler Antikörper zwischen 11 und 40 %. 4 monoklonale Antikörper erkannten Epitope, die auf beiden Zelltypen vorkommen, allerdings in unterschiedlicher Häufigkeit. Sie markierten zwischen 11 und 40 % der Thymuszellen und nur zwischen 0,1 und 10 % der Milzzellen.

5. Diskussion

Bereits durch konventionelle Methoden (Rosettentechnik, Nachweis von Komplement- und Ig-Fc-Rezeptoren an der Zelloberfläche, Oberflächen-Immunglobulin) ist bekannt, daß sich das Immunsystem aus verschiedenen Zellen zusammensetzt, die anhand ihrer mit unterschiedlichen Eigenschaften ausgestatteten Oberflächen differenziert werden können. Es ist möglich, B- und T-Zellen anhand dieser Methoden zu unterscheiden, und man vermutete, daß weitere Subpopulationen existieren, denen verschiedene Funktionen im Rahmen der Immunantwort zukommen. Durch die Entwicklung der Hybridisierungstechnik von KÖHLER und MILSTEIN (1975) ist es möglich, monoklonale Antikörper als Werkzeug für die Differenzierung der Immunzellen heranzuziehen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, monoklonale Antikörper gegen Schweinelymphozyten herzustellen. Es wurden 15 Fusionen nach verschiedenen Immunisierungsschemata durchgeführt. Die höchsten Serum-Antikörpertiter wurden bei Schema VI gemessen, was auf das günstigste Zeitintervall zwischen den Immunisierungen und damit auf eine hohe Zahl an aktivierten B-Lymphozyten schließen läßt, die als bevorzugte Fusionspartner gelten (ANDERSON und MELCHERS, 1978).

Die Hauptschwierigkeiten bei der Produktion von monoklonalen Antikörpern liegen in der großen Instabilität der Hybridomzellen. Dies gilt besonders für die Zeit direkt nach der Fusion sowie unmittelbar nach der Klonierung. Trotz der Anwendung von Peritonealmakrophagen als Feeder-Zellen, die sich sehr positiv auf Fusions- und Vermehrungsergebnisse auswirken (FAZEKAS DE ST.GROTH und SCHEIDEGGER, 1980), gehen in diesem Zeitraum die meisten Kolonien und Klone verloren. Die große Instabilität wird von fast allen Autoren beschrieben (FAZEKAS DE ST.GROTH und SCHEIDEGGER, 1980; KÖHLER, 1981). Zweifellos hängt sie mit dem Syntheseverlust von H- und L-Ketten zusammen, der durch Chromosomenverlust (KÖHLER, 1980) und/oder Überwachsen durch nicht-produzierende Klone während der Vermehrungsphase hervorgerufen wird (GERHARD et al., 1978).

Eine weitere Ursache für den Verlust von zunächst Antikörper-positiven Hybridomzellen kann in der Kontamination der Kulturen mit Mykoplasmen liegen. Diese kann bereits in den parental Linien stattgefunden haben (KÖHLER, 1981) und führt ebenfalls zur Einstellung des Wachstums.

Aus unseren Fusionen gingen 147 Hybridomlinien hervor, von denen 68 Antikörper zu weiteren Untersuchungen ausgewählt wurden. 56 % von ihnen wurden als IgM-Antikörper, 41 % als IgG1 und 3 % als IgG2a bzw. IgG2b charakterisiert. Diese Verteilung entspricht der Beobachtung, daß unter natürlichen Bedingungen zunächst der IgM-Titer und nachfolgend der IgG-Titer ansteigt und wurde auch von FAZEKAS DE ST.GROTH und SCHEIDEGGER (1980) und GERHARD et al. (1980) beschrieben.

Die Klassifizierung als IgM-Antikörper konnte oft erst nach Mercapto-äthanol-Behandlung erfolgen. Der Grund hierfür liegt u.U. in der mangelnden Reinheit des Antigens bzw. des zweiten Antikörpers im ELISA.

Der monoklonale Antikörper 17V2.1 konnte hinsichtlich der Subklasse IgG2a bzw. IgG2b nicht eindeutig charakterisiert werden. Die Ursache hierfür kann in der nahen Verwandtschaft dieser Subklassen und der dadurch möglichen Kreuzreaktion liegen.

Die große Variation der monoklonalen Antikörper beim Vergleich der Antikörpertiter im Zell-ELISA ist auf verschiedene Ursachen zurückzuführen. Die Höhe des Titers wird zum einen durch die Konzentration der Antikörper im Zellkulturüberstand bestimmt, zum anderen richtet sie sich nach der Häufigkeit der antigenen Determinanten, die die Antikörper erkennen. Ein niedriger Antikörpertiter kann also für eine geringe Konzentration der monoklonalen Antikörper im Zellkulturüberstand stehen, aber auch durch eine hohe Spezifität (seltene Epitope) bedingt sein. Es ist von einer unterschiedlichen Konzentration der Antikörper auszugehen, da sie von der Zahl, der Teilungsgeschwindigkeit und der Antikörper-Produktionsrate der Zellen in der Kultur abhängt (FAZEKAS DE ST.GROTH und SCHEIDEGGER, 1980).

IgG-Antikörper, mit Ausnahme von IgG1 (RICHMAN, 1983) können mit Hilfe von Protein-A gereinigt werden, d.h. IgG kann von anderen Serum-

proteinen (Albumin) und anderen Immunglobulinen separiert werden. Die Immunglobulinkonzentrationen der Protein-A-Eluate weisen beträchtliche Unterschiede auf (17V14.3: 1,6 µg/ml und 21V38.1: 31,9 µl/ml Zellkulturüberstand). Vergleicht man die Antikörper-Titer der Zellkulturüberstände mit den Proteinkonzentrationen im Säuleneluat, so ist auffällig, daß die geringsten Antikörper-Titer (21V38.1: 1:2) die höchsten Proteinkonzentrationen (31,9 µg/ml) aufweisen und daß umgekehrt hohe Antikörper-Titer (16V6.9: 1:5120) mit niedrigen Proteinkonzentrationen (9,2 µg/ml) einhergehen. Dies spricht dafür, daß nicht die Menge der Antikörper, sondern die Häufigkeit des Epitops, das die Antikörper erkennen, entscheidend für die Höhe des Titers ist.

Indem man Hybridomzellen an Mäuse zur Vermehrung in Ascites verabreicht, läßt sich die Konzentration der monoklonalen Antikörper erheblich steigern. Der Vergleich von Protein-A-Eluat aus Zellkulturüberstand und Eluat aus Exsudat ergab um 27- bis 153fach höhere Proteinkonzentrationen im Exsudat. Sie liegen damit in dem von KÖHLER und MILSTEIN (1976) und POLLOCK et al. (1984) beschriebenen Bereich. Der entsprechende Vergleich der Antikörpertiter ergab Steigerungen um das 5- bis 200-fache in den Exsudaten.

Die IgM-Antikörper sind der Reinigung, wie sie für IgG-Antikörper durchgeführt wurde, nicht zugänglich (RICHMANN 1983). Für IgM-Antikörper kann eine Tandemsäule aus Protein-A und Concanavalin A angewendet werden. Diese Methode ist jedoch aufwendig und mit höheren Verlusten an Antikörpern verbunden. Ob die IgM-Antikörper eine niedrige Spezifität aufweisen, wie sie GERHARD et al. (1981) beschrieben haben, muß sich erst noch herausstellen. Beim Vergleich ihrer Titer gegen Anti-IgM wiesen die meisten IgM-Antikörpertiter um $1 : 1 \times 2^{13}$ auf. Diese Methode ist jedoch weitaus ungenauer als die Proteinbestimmung und gibt lediglich einen groben Anhaltspunkt über die Menge der Antikörper.

Zur Produktion von monoklonalen Antikörpern wurde im murinen System gearbeitet, da dies zu den am häufigsten verwendeten und am besten charakterisierten Systemen zählt und geeignete Myelomzelllinien zur Verfügung stehen. Die Immunisierung erfolgte mit Schweinelymphozyten. Es

ist von großem Interesse, welche Antigene auf den Schweinezellen die Antikörper-Produktion der murinen B-Lymphozyten induzieren und damit die Spezifität der monoklonalen Antikörper bedingen. Bei einer xenogenen Immunisierung sind Antikörper gegen verschiedene Antigengruppen möglich: Zum einen Antikörper gegen Schweine-spezifische Antigene und Spezies übergreifende Antigene (heterophile Antikörper), zum anderen Antikörper gegen Membranimmunglobuline vom Schwein. Desweiteren und für uns von besonderem Interesse sind Antikörper gegen Differenzierungsantigene (analog den LYT-Antigenen der Maus) und Histokompatibilitätsantigenen (SLA-Antigene) der Schweinelymphozyten.

Um eine Charakterisierung der monoklonalen Antikörper hinsichtlich ihrer Spezifität vorzunehmen, wurde zunächst getestet, welche Zellen vom Schwein die Antikörper erkennen. Von den untersuchten Zellen reagierten alle monoklonalen Antikörpern mit Lymphozyten (PBL) und schwach mit Thymuszellen, nur wenige reagierten mit Thrombozyten, Granulozyten und Milzzellen, und keiner markierte Erythrozyten. Der Prozentsatz, der durch die monoklonalen Antikörper markierten Zellen variierte sehr stark. Der überwiegende Anteil der Antikörper markierte nur einen Teil der Lymphozyten (0,1 - 40 %) und Thymuszellen (0,1 - 10 %). Auch von den Thrombozyten wurde nur ein Teil (0,1 - 40 %) erkannt, ebenso wie von den Milzzellen (0,1 - 10 %). Bei den Granulozyten liegt die Spanne dagegen verteilt (0,1 - 100 %).

Interessant ist die Verteilung bei denjenigen monoklonalen Antikörper, die Leukozyten markierten. Es fallen 7 Antikörper auf, die zwischen 71 und 100 % der Granulozyten markierten (16V40.10, 16V97.1, 16V97.2, 16V97.8, 15V20.1, 16V20.2 und 16V20.3) und andere Zellen nur zu einem geringen Prozentsatz erkannten. Möglicherweise handelt es sich hier um monoklonale Antikörper, die spezifisch für Granulozyten sind.

Einen Prozentsatz von 11 bis 40 % Markierung bei Thymuszellen wiesen 7 monoklonale Antikörper auf (21V9.1, 16V6.9.9, 16V23.2, 15V17.2, 15V50.1, 15V50.7 und 21V38.1). Diese Werte korrelierten immer mit einem höheren Prozentsatz bei der Lymphozytenmarkierung, was eine Spezifität für T-Lymphozyten vermuten läßt. Allerdings wiesen alle

außer 21V38.1 auch eine Markierung von Milzzellen von 0,1 - 10 % auf. 21V38.1 wies anstelle der Markierung bei Milzzellen eine 0,1 - 10 %ige Markierung bei Granulozyten auf.

Eine deutliche Markierung von Thrombozyten (41 - 60 %) wiesen 16V15.5 und 16V15.10 auf. Die monoklonalen Antikörper 17V14.1, 17V14.2, 17V14.3, 17V14.4 und 17V14.5 markierten 21 - 40 % der Thrombozyten, jedoch erkannten sie ähnlich viele Lymphozyten, Granulozyten und Thymuszellen, was gegen eine Spezifität für eine bestimmte Zellart spricht.

Alle monoklonalen Antikörper, die aus einer Klonierung stammten, zeigten eine deutliche Übereinstimmung im Verhalten, und war anzunehmen, daß sie das gleiche Epitop erkennen.

Anhand der vorliegenden Versuche läßt sich eine Spezifität der gewonnenen monoklonalen Antikörper erwarten. Welche Zellen sie im einzelnen erkennen, kann nur durch weiterführende Untersuchungen wie z.B. der Trennung von B- und T-Zellen über Nylonwolle, Rosetten- und Panning-technik und der Beeinflussung von Lymphozytenfunktionen wie Mixed Lymphocyte Reaktion, Stimulationstests und zytotoxischen Reaktionen geklärt werden.

6. Zusammenfassung

Milzzellen von BALB/c-Mäusen, die mit Schweinelymphozyten immunisiert worden waren, und Myelomzellen (P3-X63-Ag8.653) wurden fusioniert und durch Limiting Dilution kloniert. Es wurden 147 Klone mit einer stabilen Produktion von monoklonalen Antikörpern gegen Schweinelymphozyten etabliert. Von diesen wurden 68 Klone ausgewählt, deren monoklonale Antikörper einer Charakterisierung hinsichtlich der Immunglobulinklassen und -subklassen unterzogen wurden. Die gewonnenen Antikörper wurden als IgM, IgG1 und IgG2 identifiziert. Ferner wurden die Antikörpertiter im Zellkulturüberstand ermittelt. Von Antikörpern der IgM-Klasse wurden die IgM-Titer bestimmt und Antikörper der IgG-Klasse wurden mit Hilfe der Protein-A-Affinitätschromatographie gereinigt und ihre Konzentrationen im Eluat ermittelt. Sechs der IgG-produzierenden Hybridomzelllinien wurden an BALB/c-Mäuse zur Vermehrung im Ascites verabreicht. Das Exsudat wurde ebenfalls gereinigt und mit den Werten im Zellkulturüberstand verglichen. Weiterhin wurde ein Teil der monoklonalen Antikörper mittels der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese dargestellt.

Alle 68 monoklonalen Antikörper wurden mit Hilfe des Cytofluorometrie untersucht. Gemessen wurde der Prozentsatz der von den Antikörpern markierten peripheren Lymphozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Erythrozyten, Thymus- und Milzzellen von Schweinen. Bei dieser Charakterisierung reagierte keiner der Antikörper mit Erythrozyten, einige jedoch mit Thrombozyten und Granulozyten. Während alle Antikörper Thymuszellen vom Schwein schwach markierten, reagierten nur verhältnismäßig wenige Antikörper mit Milzzellen. Dies spricht dafür, daß verschiedene Subpopulationen der betreffenden Zellarten durch monoklonale Antikörper markiert werden.

Summary

Production of monoclonal antibodies reactive with porcine lymphocytes

Spleen cells from BALB/c mice, that had been immunized with swine lymphocytes and myeloma cells (P3-X63-Ag8.653) were fused and cloned by limiting dilution. 147 clones with stable production of monoclonal antibodies against swine lymphocytes were established. Of these, 68 clones were selected and their monoclonal antibodies were characterized with respect to immunoglobulin classes and -subclasses. The antibodies produced were identified as IgM, IgG1 and IgG2. Moreover their antibody titer was evaluated in the culture supernatant. The IgM-Titer of antibodies of the IgM class was determined. Antibodies of the IgG class were purified using protein-A-affinity chromatography and their protein concentration was determined. Six of the IgG producing hybridoma cell-lines were administered to BALB/c mice for multiplication in ascites. The ascites-fluid was also purified and compared with the values of the cellculture supernants. In addition some of the monoclonal antibodies were analyzed and presented on the basis of polyacrylamide-gel-electrophoresis.

All 68 monoclonal antibodies were examined using the cytofluorometry. The percentage of lymphocytes, thrombocytes, granulocytes, erythrocytes and thymus- and spleen-cells of swine marked by antibodies was measured. None of the antibodies marked erythrocytes, some, however, showed a reaction to thrombocytes and granulocytes. Whereas all antibodies marked porcine thymuscells relatively few antibodies did so with spleen cells. These data suggest that various subpopulations of the examined cell types are marked by the monoclonal antibodies.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- ANDERSON, J./MELCHERS, F. (1978):
The antibody repertoire of hybrid cell lines obtained by fusion
of X63-Ag8 myeloma cells with mitogen activated B-cell
blasts
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81: 130-139
- ASHWOOD-SMITH, M.J. (1971):
Radioprotective and cryoprotective properties of DMSO.
In: Dimethylsulfoxide. S.W. Jacobs, E.E. Rosenbaum, D.L. Wood
(Hrsg.), pp. 147-187, Marcel Dekker, Inc. New York
- BARSKI, G./SORIEUL, S./CORNEFERT, F. (1961):
"Hybrid" type cells in combined cultures of two different
mammalian cell strain
J. natl. Cancer Inst. 26: 1269-1291
- BASTEN, A./HOWARD, J.G. (1973):
Thymus independence.
Contemp. Top. Immunobiol. 2: 265-291
- BINNS, R.M./FEINSTEIN, A./GURNER, B.W./COOMBS, R.R.A. (1972):
Immunoglobulin determinants on lymphocytes of adult, neonatal
and foetal pigs
Nature New Biol. 239: 114
- BINNS, R.M./LICENCE, S.T./SYMONS, J.B.A./GURNER, B.W./COOMBS, R.R.A./
WALTERS, D.W. (1979a):
Comparison of the direct anti-globulin-rosetting reacting
(DARR) and direct immuno-fluorescence (DIF) for demonstra-
ting of slg-bearing lymphocytes in pig, sheep and cattle
Immunology 36: 549
- BINNS, R.M. (1982):
Organisation of the lymphoreticular system and lymphocyte
markers in the pig
Vet. Immunol. Immunopathol. 3: 95
- BINNS, R.M./LICENCE, S.T./GURNER, B.W./COOMBS, R.R.A. (1983):
The demonstration of slg, MHC and T-cell antigens and Fc-
receptors on the lymphocyte surface by anti-globulin ro-
setting reactions: Some technical considerations
J. of Immunol. Meth. 63: 69-80
- BIOZZI, G./MOUTON, D./SANT'ANNA, O.A./PASSOS, H.C., GENNARI, M./
REIS, M.H./FEIRREIRA, V.C.A./HEUMANN, A.M./BOUTHILLIER, Y./
IBANEZ, O.M./STIFFEL, C./SIQUEIRA, M. (1979):
Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the
mouse.
Curr. Top. in Microbiol. and Immunol. 85: 31-98

- BIOZZIZ, G./ASOFSKY, R./LIEBERMANN, R./STIFFEL, C./MOUTON, D./
BENACERRAF, B. (1970):
Serum concentration and allotypes of immuno-globulins in
two lines of mice genetically selected for "high" and "low"
antibody synthesis
J. Exp. Med. 132: 752-764
- BORTOLOZZI, J./HINES, H.C. (1982):
Histocompatibility antigens and diseases resistance in Jersey
breed of cattle
2nd World Congress of Genetics applied to Livestock Production
Madrid, 1982, Vol. 7: 325-330
- BRILES, W.E./STONE, H.A./COLE, R.K. (1977):
Mareck's disease: effects of B histocompatibility alloalleles
in resistance and susceptible chicken lines
Science 195: 193-195
- BRODEUR, B.R./TSANG, P./LAROSESE, Y. (1984):
Parameters affecting ascites tumor formation in mice and
monoclonal antibody production
J. Immun. Meth. 71: 265-272
- BROWN, G./GREAVES, F. (1974):
Enumeration of absolute numbers of T and B lymphocytes
in human blood
Scand. J. Immunol. 3: 161
- BUSCHMANN, H. (1973):
Causes of variation of phagocytic activity in mice and the role
of genetic influences
In: Non-specific factors influencing host resistance, eds.:
Braun, W., Ungar, J., Karger, Basel
- BUSCHMANN, H./JUNGE, V./KRÄUSSLICH, H./RADZIKOWSKI, A. (1974):
A study of the immune response to sheep erythrocytes in
several breeds of swine
Med. Microbiol. Immunol. 159: 179-190
- BUSCHMANN, H./PAWLAS, S. (1980):
Vergleichende Untersuchungen an den Lymphozyten-Subpopu-
lationen von Rind und Schwein
Zbl. Vet. Med. B, 27: 190-206
- BUSCHMANN, H./MEYER, J. (1981):
Resistentenzucht bei der Maus
Zbl. Vet. Med. B, 28: 713-732
- CALNEK, B.W. (1985):
Genetic resistance
In: Marek's Disease. Scientific Basis and Methods of Control
ed. L.N. Payne, Martinus Nijhoff Publishing

- CAMPBELL, A.M. (1984):
Monoclonal Antibody Technology. The Production and Characterisation of rodent and human hybridomas.
BURDON, R.H., VAN KNIPPENBERG, P.H. (Hrsg.), Elsevier Science Publishing Company, Inc., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford
- CAZENAVE, P.A. (1977):
Idiotypic - Antiidiotypic regulation of antibody synthesis in rabbits
Proc. Natl. Acad. Sci., USA 74: 5122-5125
- CHALON, M.P./MILNE, R.W./VAERMAN, J.P. (1979):
Interaction between mouse immunoglobulins and staphylococcal protein A
Scand. J. Immunol. 9: 359-364
- CLAFLIN, L./WILLIAMS, K. (1978):
Mouse myeloma-spleen cell hybrids: Enhanced hybridization frequencies and rapid screening procedures
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81: 107-109
- COOPER, M. (1978):
Immune deficiency I Springer Seminars
Immunopathol. 1: 235-321
- CORTE, G./MINGARI, M.C./MORETTA, A./DAMIANI, G./MORETTA, L./BARGELLESÌ, A. (1982):
Human T cell subpopulations defined by a monoclonal antibody. I. A small subset is responsible for proliferation to allo-genic cells or to soluble antigens and for helper activity for B cell differentiation
J. Immunol. 128 (1): 16-19
- COFFINO, P./BAUMAL, R./LASKOV, R./SCHARFF, M.D. (1972):
Cloning of mouse myeloma cells and detection of rare variants
J. Cell Physiol. 79: 429-440
- COTTON, R.G.H./SECHER, D.S./MILSTEIN, C. (1973):
Somatic mutation and the origin of antibody diversity.
Clonal variability of the immunoglobulin produced by MOPC 21 cells in culture
Europ. J. Immunol. 3: 135-140
- COTTON, R.G.H./MILSTEIN, C. (1973):
Fusing of two immunoglobulin producing myeloma cells
Nature 244: 42-43
- CROCE, C.M./KOPROWSKI, H./EAGLE, H.H. (1972):
Defect of invironmental pH on the efficiency of cellular hybridisation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1953-1956
- DAVIDSON, R.L./GERALD, P.S. (1976):
Improved techniques for the induciun of mammalian cell hybridization by polyethylene glycol
Somat. Cell Genet. 2: 165-176

- DAVIDSON, R.L./O'MAUY, K.A./WHEELER, T.B. (1976):
Polyethylene glycol-induced mammalian cell hybridization.
Effect of polyethylene glycol molecular weight and concentration
Somat. Cell Genet. 2: 271-280
- DAVIE, J.M./PAUL, W.E. (1974):
Role of T lymphocytes in the humoral immune response.
I. Proliferation of B lymphocytes in thymus-deprived mice
J. Immunol. 113: 1483-1445
- DAVIS, W.C./YILMA, T./PERRYMAN, L.E./MCGUIRE, T. (1985):
Perspectives on the application of monoclonal antibody and
Transfection Technology in Veterinary Microbiology
Proc. Vet. Microbiol. Immun., 1: 1-24
- DAUSSET, J./SVEJGAARD, A. (1977):
HLA and diseases
eds.: Munksgaard, Copenhagen
- DRESSER, D.W./MITCHISON, N.A. (1968):
The mechanism of immunological paralysis
Adv. Immunol. 8: 129-181
- ENTRINGER, G. (1980):
Untersuchungen zur Variation der mitogeninduzierten Stimula-
tion von Rinderlymphozyten
Vet. med. Diss. München
- ERNST, B. (1980):
Immunhistologie
In: Immunologische Arbeitsmethoden, Frimmel, H. (Hrsg.),
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- ESHAR, Z./APTE, R./LÖWY, I./BEN-NERIAH, Y./GIVOL, D./MOZES, E.
(1980):
T cell hybridomas bearing heavy chain variable region de-
terminants producing (T,G)-A-L-specific helper factors
Nature 286: 270-272
- FAZEKAS DE ST.GROTH, S./SCHEIDEGGER, D. (1980):
Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics
J. Immunol. Meth. 35: 1-25
- FORSGRÉN, A./SJOQUIST, J. (1966):
Protein A from *S. aureus*. I. Pseudo-Immune reaction with
human γ -globulin
J. Immunol. 97: 822-827
- FRANKEL, M.E./GERHARD, W. (1979):
The rapid determination of binding constants for antiviral anti-
bodies by a radioimmunoassay. An analysis of the interaction
between hybridoma proteins and influenza virus
Molec. Immunol. 16: 101-106

- GEARHART, P.J./JOHNSON, N.D./DOUGLAS, R.D./HOOD, L. (1981):
IgG antibodies to phosphocholine exhibit more diversity than
their IgM counterparts
Nature 291: 29-34
- GERHARD, W./CROCE, C.M./LOPES, D./KOPROWSKI, H. (1978)
Repertoire of antiviral antibodies expressed by somatic cell
hybrids
Proc. natl. Acad. Sci. 75: 1510-1514
- GERSHON, R.K./KONDO, K. (1971):
Infectious Tolerance
Immunology 21: 903
- GÖTZE, D. (1977):
The major histocompatibility system in man and animals
Springer-Verlag, New York, 406 ff.
- HABER, E./MAGOLIES, M.N./CANNON, L.E. (1977):
Structure of the framework and complementary regions of
elicited antibodies
In: Antibodies in human diagnosis and therapy
E. Haber, R.M. Krause (Hrsg.), pp. 45-77, Raven Press,
New York
- HARRIS, H./WATKINS, J.F. (1965):
Hybrid cells derived from mouse and man: Artificial hetero-
karyous of mammalian cells from different species
Nature 205: 640-646
- HENGARTNER, H./LUZZATI, A.L./SCHREIER, M. (1978):
Fusion of *in vitro* immunized lymphoid cells with X63-Ag8
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81: 92-99
- HOLLINGSHEAD, M.G./TONKONOGY, S.G./DE BUYSSCHER, E.V. (1985):
A method for the accurate determination of the specificity of
monoclonal antibodies reactive with porcine immunoglobulins
Vet. Immunol. Immunopath. 10: 167-175
- HORIBATA, K./HARRIS, A.W. (1970):
Mouse myelomas and lymphomas in culture
Exp. Cell Res. 60: 61-77
- JANEWAY, C.A. (1980):
Manipulation of the Immune Response by Anti-idiotypic
In: *Immunology 80. Forth International Congress of Immunology*
M. Tongerean and J. Dausset (Ed.), Academic Press, London,
New York, S. 1149-1159
- JERNE, N.K. (1973):
The immune system (Network theory)
Scientific America, p. 52

- JONJIC, S./KOSZINOWSKI, U. (1984):
Monoclonal Antibodies reactive with swine lymphocytes
J. of Imm. 133: 647-652
- KATZ, D.H./BENACERRAF, B. (1972):
The regulatory influence of activated T cells on B cell
response to antigen
Adv. Immunol. 15: 1-94
- KATZ, D.H./BENACERRAF, B. (1976):
The role of products of the histocompatibility gene complex
in immune response
Academic Press Inc., New York
- KATZ, D.H. (1980):
Adaptive differentiation of lymphocytes: Theoretical impli-
cations for mechanisms of cell-cell recognition and regulation
of immune responses
Adv. Immunol. 29: 137-207
- KATZ, D.H. (1977):
Lymphocyte differentiation, Recognition and Regulation
Academic Press, New York, S. 631-675
- KEARNEY, J.F./RADBRUCH, A./LIESEGANG, B./ROJEWSKY, K. (1979):
A new mouse myeloma cell line which has lost immunoglobulin
expression but permits the construction of antibody secreting
cell lines
J. Immunol. 123: 1548-1550
- KENNETT, R.H./DENIS, K.A./TUNG, A.S./KLINMAN, N.R. (1978):
Hybrid plasmacytoma production: Fusion with adult spleen
cells, monoclonal spleen fragments, neonatal spleen cells and
human spleen cells
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81: 77-91
- KIRK, R.G./TOSTESON, D.C. (1973):
Cation transport and membrane morphology
J. Membr. Biol. 12: 273-285
- KLEIN, J. (1979):
The major histocompatibility complex of the mouse
Science 203: 516-521
- KLEINSCHMIDT, A. (1983):
Eine Selektion auf Antikörperbildungsvermögen gegenüber
DNP-Hapten beim Schwein
Biol. Diss. München
- KÖHLER, G./MILSTEIN, C. (1975):
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-
defined specificity
Nature 256: 495-497

- KÖHLER, G./MILSTEIN, C. (1976):
Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion
Europ. J. Immunol. 6: 511-519
- KÖHLER, G./HOWE, S.C./MILSTEIN, C. (1976):
Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines
Europ. J. Immunol. 6: 292-295
- KÖHLER, G./HENGARTNER, H./MILSTEIN, C. (1978):
The sequence of immunoglobulin chain losses in mouse (myeloma x B-cell) hybrids
In: *Protides of Biological Fluids*. H. Peeters (ed.), pp. 545-549, Pergamon Press, Oxford and New York
- KÖHLER, G./SHULMAN, M.J. (1978):
Cellular and molecular restrictions of the lymphocyte fusion
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81: 143-149
- KÖHLER, G. (1980):
Immunoglobulin chain loss in hybridoma lines
Proc. natl. Acad. Sci. 77: 2197-2199
- KÖHLER, G. (1981):
The technique of hybridoma production
Immunological Methods, Vol.II, S. 293, Acad. Press Inc.
- KOPROWSKI, H./GERHARD, W./CROCE, C.M. (1977):
Production of antibodies against influenza virus by somatic cell hybrids between mouse myeloma and primed spleen cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 2985-2988
- KRÄUSSLICH, H./BUSCHMANN, H./MEYER, J./KLEINSCHMIDT, A. (1983):
Ein Selektionsversuch auf Antikörperbildungsvermögen beim Schwein
Zeitschrift f. Tierzüchtung u. Züchtungsbgiologie, Bd. 100, Heft 2, S. 101-108
- KRONVALL, G./GREY, H.M./WILLIAMS, R.C.J. (1970c):
Protein A reactivity with mouse immunoglobulins
J. Immunol. 105: 1116-1123
- LÄMMLI, U.K. (1970):
Clearage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature 227: 680-685
- LASKOV, R./SCHARFF, M.D. (1970):
Synthesis assembly and secretion of gamma globuline by mouse myeloma cells. I. Adaption of murine plasma cell Tumor-11 to culture cloning and characterization of gamma globulin subunits
J. exp. Med. 131: 515-541
- LEFKOVITS, I. (1972):
Induction of antibody-forming cell clones in microcultures
Europ. J. Immunol. 2: 360-366

- LEHMANN, P.F. (1985):
Immunology of fungal infections in animals
Vet. Immun. a. Immunopath. 10: 33-69
- LEWIN, H.A./DAVIS, W.C./BERNOCO, D. (1985a):
Monoclonal antibodies that distinguish bovine T and B lymphocytes
Vet. Imm. and Imm.pathology 9: 87-102
- LEWIN, H.A./CALVERT, C.C./BERNOCO, D (1985b):
Cross-reactivity of a monoclonal antibody with bovine, equine, ovine, and porcine peripheral blood B lymphocytes
Am. J. of Vet. Res. Vol. 46: 785-788
- LIACOPOULUS-BRIOT, M./BOUTHILLER, Y./MOUTON, B./LAMBER, F./DECREUSEFOND, C./STIFFEL, D./BIOZZI, G. (1972):
Comparison of skin allograft rejection and cytotoxic antibody-production in two lines of mice genetically selected for "high" and "low" antibody-synthesis
Transplantation 14: 590-596
- LIEBERMANN, R./STIFFEL, C./ASOFSKY, R./MOUTON, D./BIOZZI, G./BENACERRAF, B. (1972):
Genetic factors controlling antisheep erythrocyte antibody-response and immunoglobulin synthesis in backcross and F2 progeny of mice genetically selected for "high" and "low" antibody synthesis
J. Exp. Med. 136: 790-798
- LITTLEFIELD, J.W. (1964):
Selection fo hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants
Science 145: 709-710
- LOEGDBERG, L./WASSMER, P./SHEVACH, E.M. (1985):
Role of the L3T4 antigen in T-cell activation. I. Description of a monoclonal IgM antibody to a distinct epitope (L3T4b) of the L3T4 antigen and its effect on interleukin 1-induced thymocyte proliferation
Cell Immunol. 94(2): 299-311
- LONGENECKER, B.M./PAZERKA, F./GAVORA, J.S./SPENCER, J.L./RUTH, R.F. (1976):
Lymphoma induced by herpesvirus: resistance associated with a major histocompatibility gene
Immunogenetics 3: 401-407
- LOWRY, O.H./ROSEBROUGH, N.J./FARR, A.L./RANDALL, R.J. (1951):
Protein measurement with the folin phenol reagent
J. Biol. 193: 265-275
- MEYER, J./KRÄUSSLICH, H./RADZIKOWSKI, A./BUSCHMANN, H./OSTERKORN, K. (1973):
Variationsursachen der Phagozytoseaktivität bei Mäusen
Ztschr. Tierz. Züchtungsbiol. 90: 94

- MILSTEIN, C./KÖHLER, G. (1977):
All fusion and the derivation of cell lines producing specific antibodies. Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, E. Haber, R.M. Krause (Hrsg.), pp. 271-284, Raven Press, New York
- MILSTEIN, C./GALFRE, G./SECHER, D.S./SPRINGER, T. (1979):
MOncloclonal antibodies and cell surface antigens
Cell Biol. Int. Rep. 3: 1-16
- MILSTEIN, C./ADETUGBO, K./COWAN, N.J./KÖHLER, G./SECHER, D.S./WILDE, C.D. (1977):
Somatic cell genetics of antibody-secreting cells: Studies of clonal diversification and analysis by cell fusion
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41: 793-803
- MILLER, J.F.P. (1980):
MHC restrictions in cellular cooperation
Prog. Immunol. 4: 359-374
- MORETTA, L./MINGARI, M.C./MORETTA, A./HAYNES, B.F./FAUCI, A.S. (1980):
T cell Fc-Receptors as markers of functional human lymphocyte subsets
In: Immunology 80, Forth Internat. Congress of Immunology, M. Fougereau u. J. Dausset (Ed.), Academic Press, London, New York, S. 223-238
- MORETTA, A./CORTE, G./MINGARI, M.C./MORETTA, L. (1982):
Human T cell subpopulations defined by a monoclonal antibody
J. of Immunol. 128: 20-23
- MORRIS, J.A./THORNS, C.J./BOARER, C. (1985):
Evaluation of a monoclonal antibody to the K99 fimbrial adhesin produced by Escherichia coli enterotoxigenic for calves, lambs and piglets
Research in Vet. Sc. 39: 75-79
- MUSCOPLAT, C.C. / ALHAJI, J. / JOHNSON, D.W. / POMEROY, K.A. / OLSON, J.M./LARSON, V.L./STEVENS, J.B./SORONSEN, D.K. (1974a):
Characteristics of lymphocyte responses to phyto mitogens: Comparison of responses of lymphocytes from normal and lymphotoxic cows
Am. J. vet. Res. 35: 1557-1561
- NEFF, J.M./ENDERS, S.F. (1968):
Poliovirus replication and cytopathogenicity in monolayer hamster cultures fused with beta propiolactone inactivated Sendai virus
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 127: 260-267
- NORWOOD, T.H./ZEIGLER, C.J./MARTIN, G.M. (1976):
Dimethyl sulfoxide enhanced polyethylene glycol-mediated somatic cell fusion
Somat. Cell Genet. 2: 263-270

- NOWINSKI, R.C./LOSTROM, M.E./TAM, M.R./STONE, M.R./BURNETTE, W.N. (1979):
The isolation of hybrid cell lines producing monoclonal antibodies against the p15(E) protein of ecotropic murine leukemia viruses
Virology 93: 111-126
- NOWINSKI, R.C./STONE, M.R./TAM, M.R./LOSTROM, M.E./BURNETTE, W.N./O'DONNELL, P.V. (1980):
Mapping of viral proteins with monoclonal antibodies. Analysis of the envelope proteins of murine leukemia viruses
In: *Monoclonal antibodies*, R.H. Kennett, T.J. McKearn, K.B. Bechtol (Hrsg.), pp. 317-333, Plenum Press, New York and London
- PAUL, P.S./VAN DEUSEN, R./MENGELING, W.L. (1985):
Monoclonal precipitating antibodies to porcine Immunoglobulin M
Vet. Immunol. Immunopath. 8: 311-328
- PERRYMAN, L.E. (1979):
Primary and secondary immune deficiencies of domestic animals
In: *Advances Vet. Sci. Comp. Med.* 23, S. 23-52, C.A. Brandley and C.E. Cornelius (Ed.)
- PESCOVITZ, M.P./LUNNEY, J.K./SACHS, D.H. (1984):
Preparation and Characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL
J. of Immunol. 133: 368-375
- PIERCE, C.W./BENACERRAF, B. (1976):
Cellular basis of immune responses
In: *Textbook of Immunopathology*, pp. 3-14
Miescher, P.A. and Muller-Eberhard, H.J. (eds.), Greene and Stratton, New York
- PIERCE, C.W./KAPP, J.A./BENACERRAF, B. (1976):
Regulation by the H-2 complex of macrophage lymphoid cell interactions in secondary antibody responses in vitro
J. exp. Med. 144: 371-381
- POLLOCK, R.R./TEILLAUD, J.-L./SCHARFF, M.D. (1984):
Monoclonal antibodies: a powerful tool for selecting and analyzing mutations in antigens and antibodies
Ann. Rev. Microbiol. 38: 389-417
- PONTECORVO, G. (1975):
Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment
Somat. Cell Genet. 1: 397-400

- POTOCNJAK, P./YOSHIDA, N./NUSSENZWEIG, R.S. (1980):
Monovalent Fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection
J. exp. Med. 151: 1504-1513
- POTTER, M. (1978):
Antigen-binding myeloma proteins of mice
Adv. Immunol. 25: 141-211
- PRESTON, P.M./BROWN, C.G.D./SPOONER, R.L.S. (1983):
Cell-mediated cytotoxicity in Theileria annulata infection of cattle with evidence for BOLA restriction
Clin. Exp. Immunol. 53
- RAFF, M.C. (1971):
The use of surface antigen to define different populations of lymphocytes of the mouse
III. Sigrid Juselius Sympos. Helsinki, 83-90, Academic Press, New York
- REAGAN, K.J./WUNNER, W.H./WIKTOR, T.J./KOPROWSKI, H. (1983):
Anti-idiotypic antibodies induce neutralizing antibodies to rabies virus glycoprotein
J. Virol. 48: 660-666
- RICH, S.S./RICH, R. (1985):
Modulation of Immunity by thymus-derived lymphocytes
In: The Modulation of Immunity, M.S. Mitchel (ed.), Pergamon Press, Oxford, p. 3-34
- RICHMAN, D.D. (1983):
The use of Staphylococcal Protein A in diagnostic virology
In: Current Topics in microbiology and immunology 104: 159-176, P.A. Bachmann (ed.), New York
- ROITT, I.M. (1985; 5. Aufl.) (1980; 4. Aufl.)
Essential Immunology
Blackwell Scientific Publications, Oxford
- SALMON, H. (1982):
Characterization of pig lymphocyte receptor for allogenic and non allogenic erythrocytes.I. Apparent common identity of both receptors
Clin. Exp. Immunol. 48: 574
- SCHIMPL, A./HÜBNER, L./WONG, C./WECKER, E. (1980):
Non-antigen-specific T cell factors.
Prog. Immunol. 4: 403-412
- SCHNURR, I. (1981):
Idiotypes. Antigens on the inside.
Workshop at the Basel Institute for Immunology, Hoffmann La Roche (ed.), Basel, nov. 19-20, pp. 122-130

- SCHREIBER, M./KÖHLER, G./HENGARTNER, H./BEREK, C./TRUCCO, M./FORNI, L. (Mitgl. d. Basel Institute f. Immunology)/STAEHELIN, T./STOCKER, J./TAKACS, B. (Mitgl. d. Roche Project of Applied Immunology) (1980):
Radio-Immuno Assay (RIA) and Enzyme Immuno-Assay (EIA)
In: Hybridoma techniques. EMBO, SKMB Course, Basel 1980, pp. 21-35
- SCHWABER, J./COHEN, E.P. (1974):
Pattern of immunoglobulin synthesis and assembly in a human-mouse somatic cell hybrid clone
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 2203-2207
- SHANNON, E.J./HASTINGS, R.C. (1977):
Methods of the identification of human-B-lymphocytes
J. Imm. Meth. 18: 321-336
- SHEMAN, D.M./ACRES, S.D./SADOWSKI, P.L./SPRINGER, J.A./BRAY, B./RAYBOULD, T.J.G./MUSCOPLAT, C.C. (1983):
Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally-administered Escherichia coli K99-specific monoclonal antibody
Infect. Immunity 42: 653-658
- SHREFFLER, D.C./DAVID, C.S. (1975):
The H-2 major histocompatibility complex and the I immune response region: genetic variation, function and organization
Adv. Immunol. 20: 125-195
- SHREFFLER, D.C. (1976):
The S region of the mouse major histocompatibility complex (H-2): Genetic variation and functional role in complement system
Transplant. Rev. 32: 140-167
- SHREFFLER, D.C./MEO, T./DAVID, C.S. (1976):
Genetic resolution of the products and functions of I and S region genes of the mouse H-2 complex
In: The Role of Products of the Histocompatibility Gene Complex in Immune Responses, pp. 3-27, Katz, D.H. and Benacerraf, B. (ed.), Academic Press, New York
- SHULMAN, M.J./WILDE, C.D./KÖHLER, R. (1978):
A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies
Nature 276: 269-270
- SMITH, K./BAKER, P./GILLIS, S./RUSSETTI, F. (1980):
Functional and molecular characteristics of T cell growth factor
Molec. Immunol. 17: 579-589.

- SNELL, G.D./DAUSSET, J./NATHENSON, S. (1976):
Histocompatibility
Academic Press, New York
- SOLBU, H./SPOONER, L./LIE, O. (1982):
A possible influence of the bovine major histocompatibility complex on mastitis
2nd World Congress on Genetics applied to Livestock Production, Madrid, 1982, Vol. 7: 368-371
- SORIEUL, S./EPHRUSSI, B. (1961):
Karyological demonstration of hybridization of mammalian cells in vitro
Nature 190: 653-654
- SPLITTER, G.A./PERRYMAN, L.E./MAGNUSON, N.S./McGURE, T.C. (1980):
Combined immunodeficiency of horses: A review Develop. Comp. Immunology 4: 21-32
- STUDIER, F.W. (1973):
Analysis of bacteriophage 77 early RNA and protein on slab gels
J. Mol. Biol. 79: 237-248
- THORPE, S.J./FEIZI, T. (1984):
Species differences in the expression of carbohydrate differentiation antigens on mammalian blood cells revealed by immunofluorescence with monoclonal antibodies
Biosci. Rep. 4: 673-685
- TRAUTWEIN, G. (1982):
Immunreaktionen und Krankheitsverlauf
Fortschritte d. Veterinärmedizin 35, 14. Kongress der Deutschen Veterinärmed. Gesellschaft, Bad Nauheim 9. - 11. April 1981, Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg, S. 45-52
- TUCKER, E.M./WRIGHT, L.J. (1982):
Monoclonal antibodies as blood-typing reagents for livestock
In: 2nd World Congress on genetics applied to Livestock Production, Madrid 4. - 8. Okt. 1982, S. 359-364
- UNANUE, E.R. (1972):
The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation
Adv. Immunol. 15: 95-166
- UNANUE, E.R./BELLER, D.I./CALDERON, J./KIELY, J.M./STADECKER, M.J. (1976):
Regulation of immunity and inflammation by mediators from macrophages
Am. J. Path. 85: 65-478

- URBAIN, J./WIKLER, M./FRANSSEN, J.-D./COLLIGNON, C. (1977):
Idiotypic regulation of the immune system by the induction of
antibodies against antiidiotypic antibodies
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5126-5130
- URBAIN, J./BRAIT, C./BRUYNS, C./DEMEUR, C./DUBOIS, P./FRANCOTTE, M./
FRANSSEN, J.-D./HIERNAUX, J./LEO, O./MARVEL, J./
MEYERS, P./MOSER, M./SLAOUI, M./TASSIGNON, J./URBAIN-
VANSANTEN, G./VAN-ACKER, A. (1985):
The Idiotypic Network: Order from the Beginning or Order out
of Chaos?
Curr. Top. in Microbiol. and Immunol. Current Topics in Mi-
crobiology and Imm. 199: 127-142
- VITETTA, E.S./KROLIK, K.A./MIYAMA-INABA, M./CUSHLEY, W./UHR, J.
(1983):
Immunotoxins: a new approach to cancer therapy
Science 219: 644-650
- WARNER, N.L. (1974):
Membran immunoglobulins and antigen receptors on B and T
lymphocytes
Adv. Immunol. 19: 67-216
- WEISS, M.C./GREEN, H. (1967):
Human-mouse hybrid cell lines containing partial complements
of human chromosomes and functioning human genes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58: 1104-1111
- YELTON, D.E./MARGULIES, D.H./DIAMNOND, B./SCHARFF, M.D. (1980):
Plasmacytomas and hybridomas
In: Monoclonal antibodies. R.H. Kennett, T.J. McKearn,
K.B. Bechtol (eds.), pp. 3-17, Plenum Press, New York and
London
- YOLKEN, R.H. (1982):
Enzyme immunoassays for the detection of infectious anti-
gens in body fluids-current limitations and further prospects
Rev. Infect. Dis. 4: 35-68
- YOLKEN, R.H. (1985):
Solid-phase enzyme immunoassay for the detection of micro-
bial antigens in body fluids
In: Manual of Clinical Microbiology, Fourth Edition, Lannette,
E.H. (ed. in chief), Am. Soc. f. Microbiology, Washington D.C.
- ZINKERNAGEL, R.M./DOHERTY, P.C. (1979):
MHC-restricted cytotoxic T-cells: studies on the biological
role of polymorphic major transplantation antigens deter-
mining T-cell restriction-specificity, function and responsiveness
Adv. Immunol. 27: 51-177

Herrn Prof. Dr. H. Buschmann bin ich zu großem Dank verpflichtet. Von ihm stammte die Anregung zu den vorliegenden Untersuchungen. Seine jederzeit gewährte Unterstützung und seine fachliche Beratung ermöglichten die Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr danke ich an dieser Stelle für sein freundliches Entgegenkommen und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. A. Kleinschmidt für die Bemühungen um die vorliegende Arbeit, insbesondere für die wertvollen Diskussionen und die erwiesene Hilfsbereitschaft im Verlaufe dieser Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Kollegen und Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie, insbesondere bei Frau T. Holy und Frau R. Schmidt.

Zuallerletzt möchte ich mich herzlich bei allen Freunden bedanken, die mit ihrem Rat und ihrer Geduld zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

LEBENS LAUF

Marlis D. Lindecke

geboren	: 22. Januar 1956 in Kirschweiler, Kreis Birkenfeld
Vater	: Wilhelm Lindecke, Landwirt
Mutter	: Edith Lindecke, geb. Mertens
1962 - 1966	: Besuch der Grundschule in Kirschweiler
1966 - 1972	: Besuch der Realschule in Idar-Oberstein
1972 - 1974	: Besuch der Fachoberschule für Sozialpflege/ Sozialpädagogik/Erziehung in Kusel/Pfalz
1974 - 1976	: Besuch der Fachhochschule für Sozialpädagogik und Sozialökonomie in Bremen
März 1976	: Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
1976 - 1982	: Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
September 1982	: Ablegung des Staatsexamens
Oktober 1982	: Approbation als Tierärztin
Februar - Mai 1983	: Praxisassistentin bei Dr. Weiss in Ludwigsburg
Juni 1983 - März 1985	: Praxisassistentin bei Dr. Bopp in Friedberg/ Bayern
Mai 1985	: Beginn der vorliegenden Dissertation
Seit Januar 1986	: Teilnehmerin des Seminars für Tropenveterinär- medizin in Berlin

